

UCH-FC
MAG-B
V 176
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE



Diferenciación genética y morfológica en *Heleobia ascotanensis* (Courty, 1907) (Caenogastropoda: Cochliopidae) del salar de Ascotán, Altiplano chileno

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Grado de

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Moisés Alberto Valladares Cortés

Diciembre, 2014

Director de Tesis:
Dr. Marco Méndez Torres

Co-director de Tesis:
Dr. Gonzalo Collado Inzulza

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER

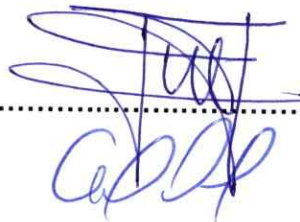
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

Moisés Alberto Valladares Cortés

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el 21 de enero de 2014.

Director de Tesis:

- Dr. Marco Méndez





Co-director de Tesis:

- Dr. Gonzalo Collado

.....

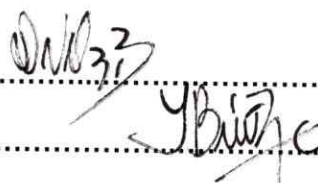
Comisión de Evaluación de la Tesis

- Dr. David Véliz

.....

- Dr. Christian Ibáñez

.....



*"The two most important days in your life are the day you are born and the day
you find out why".*

Mark Twain

RESUMEN BIOGRÁFICO



Moisés Alberto Valladares Cortés nació el 20 de julio de 1988 en Santiago de Chile. Realizó su enseñanza secundaria en el Instituto Nacional Gral. José Miguel Carrera. El año 2007 ingresó a la Universidad de Chile, obteniendo el grado de Licenciado en Ciencias con mención en Biología en 2012. El interés desarrollado durante el pregrado por los temas relacionados con biología evolutiva lo motivó a ingresar en marzo del 2012 al programa de Magíster en Ciencias Biológicas perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, y posteriormente, en el año 2014, al programa de Doctorado en Ecología y Biología Evolutiva de la misma casa de estudios.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis tutores Dr. Marco Méndez y Dr. Gonzalo Collado por enseñarme los conocimientos y técnicas, además de guiar mi desarrollo académico a lo largo de este estudio. Les agradezco por confiar en mí, por su apoyo y la constante guía durante estos últimos años.

Igualmente agradezco a Carolina, Pamela, Paola, Dayana, Carmencha, Pablo, Franco, Lucho, Hugo, Álvaro, Camilo y Claudio, a los cuales considero mis amigos del Laboratorio de Genética y Evolución (GEVOL) de la Universidad de Chile, todos ellos me ayudaron en la realización de esta tesis, y me brindaron un ambiente de amistad grato para desarrollar mi investigación.

También quisiera agradecer a mi familia, a mi madre Mercedes, mi hermana Daniela y mi tía Dora por el apoyo brindado durante toda mi formación. Gracias a ellas he podido desarrollar mis intereses en biología y cumplir mi deseo de ser científico.

Finalmente, agradezco a todos mis amigos que con su compañía me permitieron abstraerme durante breves instantes, pero que me significaron momento invaluable durante el último tiempo.

Este trabajo fue financiado por los proyectos FONDECYT 3110071 (Encargado de proyecto: Dr. Gonzalo Collado) y FONDECYT 1110188 (Encargado de proyecto: Dr. Marco Méndez)

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	12
Hipótesis 1	12
Hipótesis 2	12
OBJETIVOS	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Obtención de muestras	14
Extracción, amplificación y edición de secuencias de DNA	16
Análisis moleculares	17
Número de grupos genéticos	18
Análisis morfométricos	18
Relación entre las distancias genéticas, morfológicas y geográficas	22
RESULTADOS	23
Análisis molecular	24
Distribución geográfica de la diversidad genética	27

GENELAND	30
Análisis morfológicos	32
Morfometría geométrica de <i>landmarks</i>	32
Morfometría geométrica de contorno	34
Relación entre las distancias genéticas, distancias geográficas y distancias morfológicas	37
DISCUSIÓN	39
Diversidad genética	39
Estructura poblacional de <i>H. ascotanensis</i>	41
Estructura genética de <i>Heleobia ascotanensis</i> y taxa co- distribuidos en el salar de Ascotán	43
Variación morfológica en <i>Heleobia ascotanensis</i>	46
Variación genética, morfológica y distancias geográficas	47
Procesos evolutivos en el salar de Ascotán	47
Protección de poblaciones en ambientes naturalmente fragmentados	49
CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS	53

TABLAS

Tabla 1. Coordenadas geográficas de las vertientes analizadas en este estudio.	15
Tabla 2. Tamaños muestrales de <i>Heleobia ascotanensis</i> utilizados para el estudio morfológico y molecular.....	23
Tabla 3. Índices de diversidad genética de las vertientes del salar de Ascotán. * Las rarefacciones se realizaron con $n = 13$	25
Tabla 4. Valores de F_{ST} entre cada par de vertientes y los valores de significancia (bajo y sobre la diagonal, respectivamente).	29

FIGURAS

- Figura 1.** A) Superficie alcanzada durante los últimos 140 mil años por diferentes ciclos lacustres. Es importante notar que los períodos en los que existieron paleolagos (fases húmedas) son mucho más cortos que los eventos secos. B) Perfil Norte-Sur del Altiplano. Se indica la altitud alcanzada por los dos grandes ciclos lacustres, Ouki y Tauca (modificado de Placzek *et al.*, 2006)..... 2
- Figura 2.** Imagen satelital del salar de Ascotán. En el recuadro se indican las 12 vertientes que componen el sistema. Además se muestran fotografías de las vertientes 2 y 11 (arriba y abajo, respectivamente).
..... 4
- Figura 3.** Distribución (en verde) del género *Heleobia* en Sudamérica (modificado de Hershler y Thompson, 1992)..... 5
- Figura 4.** Red de haplotipos obtenida utilizando secuencias de la región control (*D-Loop*) del mtDNA de *Orestias ascotanensis* provenientes del salar de Ascotán (Morales *et al.*, 2011)..... 7
- Figura 5.** Estructura genética espacial obtenida en GENELAND para poblaciones de *Biomphalaria* de los salares de Carcote y Ascotán

(las vertientes analizadas están denotadas por S1, S2, S3, etc., en inglés spring) (Collado & Méndez, 2013).....	8
Figura 6. Vertientes analizadas en el salar de Ascotán.....	15
Figura 7. Se indican los landmarks (1 – 14) evaluados en el estudio morfológico para describir la forma promedio de la concha de <i>Heleobia ascotanensis</i>	20
Figura 8. Red de haplotipos de <i>Heleobia ascotanensis</i> del salar de Ascotán. Los números sobre las líneas representan el número de pasos mutacionales.....	26
Figura 9. Estructura genética espacial obtenida en GENELAND para <i>Heleobia ascotanensis</i> del salar de Ascotán (los puntos negros indican las vertientes posicionadas geográficamente al interior del sistema). A Número de clusters estimados para el salar. B Probabilidades posteriores de pertenecer a uno de los cluster 1 a 3 (de izquierda a derecha, respectivamente). Colores más claros indican mayores probabilidades de ser miembro de la población.	31
Figura 10. PCA utilizando como clasificador las vertientes de procedencia de <i>Heleobia ascotanensis</i> del salar de Ascotán. Se muestran las grillas de deformación que indican la variación en el primer y segundo componente (abajo y a la izquierda, respectivamente).	33

Figura 11. Reconstrucciones del contorno de <i>Heleobia ascotanensis</i> , con número de armónicos en incremento.	34
Figura 12. PCA clasificando los individuos de <i>Heleobia ascotanensis</i> del salar de Ascotán de acuerdo a vertiente de procedencia. En los márgenes del gráfico se muestran la variación de la concha en la primera y segunda componente (abajo y a la izquierda, respectivamente), mediante la reconstrucción de los contornos.	35
Figura 13. PCA usando como clasificador los haplogrupos de <i>Heleobia ascotanensis</i> del salar de Ascotán obtenidos en los análisis moleculares. En los márgenes del gráfico se muestran la variación de la concha en la primera y segunda componente (abajo y a la izquierda, respectivamente), mediante la reconstrucción de los contornos.	36
Figura 14. Correlación de Mantel en <i>Heleobia ascotanensis</i> del salar de Ascotán entre la distancia geográfica (m) que separa cada par de vertientes y la distancia genética (F_{ST}) entre ellas. El valor del coeficiente correlación de Mantel, $r = 0,6052$ ($p = 0,0026$).	38
Figura 15. Perfil altitudinal del salar de Ascotán. Se indica el nivel máximo que habría alcanzado el agua en el período húmedo, y la posición de las vertientes (Cruz-Jofré, datos no publicados).	41

Figura 16. Vertientes asignadas de acuerdo a los grupos genéticos determinados en 3 especies que habitan el salar de Ascotán, **A)** gasterópodos de la especie *Heleobia ascotanensis* (este estudio); **B)** gasterópodos de la especie *Biomphalaria crequii* (de acuerdo a Collado & Méndez, 2013); **C)** peces de la especie *Orestias ascotanensis* (de acuerdo a Morales *et al.*, 2011)..... 44

LISTA DE ABREVIATURAS

COI	<i>Citocromo c oxidasa subunidad I</i>
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide
DA	Análisis de función discriminante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EFD	Descriptores elípticos de Fourier
ENSO	El Niño Oscilación del Sur
ESU	Unidad evolutiva significativa
H	Diversidad haplotípica
K	Número de haplotipos (DnaSP)
CT	Número de poblaciones o clusters (GENELAND)
km ²	Kilómetros cuadrados
msnm	Metros sobre el nivel del mar
MANOVA	Análisis multivariado de la varianza
mm/año	Milímetros de agua caída por año
mtDNA	DNA mitocondrial
PCA	Análisis de componentes principales

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Π	Promedio de diferencias por par de secuencias
S	Número de sitios polimórficos
SASM	Monzón sudamericano de verano

RESUMEN

El salar de Ascotán (Altiplano chileno) constituye un ambiente de extrema altura que presenta una serie de vertientes parcial o totalmente aisladas por barreras terrestres. Estudios de variación genética realizados en el pez *Orestias ascotanensis* y el caracol *Biomphalaria crequii* han revelado la existencia de estructuración genética al interior del salar. *Heleobia ascotanensis* es un gasterópodo estrictamente acuático co-distribuido con las especies mencionadas anteriormente, por lo que es esperable que sus poblaciones presenten una estructuración genética similar.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la variación genética y morfológica en *H. ascotanensis* en once vertientes del salar, utilizando secuencias parciales de mtDNA (*COI*) y morfometría geométrica. Los análisis moleculares revelaron la presencia de tres haplogrupos [H] al interior del salar, uno adscrito a las vertientes septentrionales del salar (V2 a V6) [H1], un segundo incluyendo las vertientes centrales (V7 a V10 y V12) [H2], y un tercero sólo estaría presente en la Vertiente 11 (extremo meridional del sistema) [H3]. El estudio morfológico mostró una alta sobreposición en el espacio multivariado, y solo la Vertiente 11 mostró una diferenciación morfológica incipiente.

Los resultados sugieren que 1) los haplogrupos H1 y H2 se encuentran diferenciados genéticamente, 2) al interior de estos haplogrupos existiría flujo génico en las vertientes más cercanas geográficamente, 3) este no sería el caso de los gasterópodos de la Vertiente 11 (ubicada en el extremo sur del salar), que presentan los niveles más altos de diferenciación genética y morfológica. Además la variación encontrada en esta vertiente corresponde a un endemismo genético local, por tanto la población presente en la V11 podría corresponder a una unidad evolutiva significativa (ESU).

La estructuración genética encontrada en *H. ascotanensis* probablemente tenga relación con la posición espacial de las vertientes en el salar de Ascotán y a las restricciones topográficas impuestas por el sistema. Los resultados sugieren que la diversificación encontrada en el salar probablemente se debe a procesos de vicarianza y a una reducción en el flujo genético debido a la gran distancia entre las vertientes, producto de eventos que fragmentaron el hábitat de la especie.

ABSTRACT

The Ascotán salt pan (Chilean Altiplano) is an environment of extreme height which presents a series of springs which are partial or completely isolated by land barriers. Studies of genetic variation in the fish *Orestias ascotanensis* and the snail *Biomphalaria crequii* have revealed the existence of genetic structure within the salt pan. *Heleobia ascotanensis* is a strictly aquatic gastropod co-distributed with the above mentioned species, therefore it is expected that their populations present a similar genetic structure.

The aim of this study was to evaluate the genetic and morphological variation in *H. ascotanensis* in eleven springs, by using partial sequences of mtDNA (*COI*) and geometric morphometrics. Molecular analysis revealed the presence of three haplogroups [H] within the salt pan, one present in the northern springs of the salt pan (S2 to S6) [H1], a second including central springs (S7 to S10 and S12) [H2], and a third only present in the Spring 11 (southern end of the system) [H3]. The morphological study showed a high overlap in the multivariate space, and only S11 showed an incipient morphological differentiation.

The results suggest that 1) H1 and H2 are genetically distinct lineages, 2) within these lineages, gene flow would exist in the nearest geographically

springs, 3) this would not be the case for snails in S11 (located in the southern end of salt pan), which have the highest levels of genetic and morphological differentiation. Besides, the variation found in this spring corresponds to a local genetic endemism, therefore this population in the S11 could correspond to a significant evolutionary unit (ESU).

The genetic structure found in *H. ascotanensis* is probably related to the spatial position of the springs in the Ascotán salt pan and topographical constraints imposed by the hydrological system. The results suggest that diversification found in the salt pan is probably due to vicariance processes and reduced gene flow owing to the greater distance between the springs, product of events that fragmented the habitat of the species.

INTRODUCCIÓN

La región sur-occidental del Altiplano chileno en Sudamérica presenta un paisaje caracterizado por una serie de cuencas hidrológicas cerradas que se originaron como consecuencia de la actividad tectónica, sedimentaria y volcánica ocurrida desde el Mioceno hasta el Holoceno (Risacher *et al.*, 2003; Strecker *et al.*, 2007). En la actualidad, estas cuencas hidrológicas constituyen ambientes restringidos delimitados por cadenas de volcanes que alcanzan 4000 – 6500 m de altura (Risacher *et al.*, 2003) y cuyas depresiones centrales son ocupadas por numerosos sistemas hidrológicos, incluyendo ríos, vertientes, lagos, lagunas, bofedales y salares.

Durante el Pleistoceno en el Altiplano se sucedieron períodos húmedos que permitieron la aparición de grandes paleolagos por sobre los 3650 msnm, los cuales integraron numerosas cuencas hidrográficas aisladas en la actualidad (Fornari *et al.*, 2001; Placzek *et al.*, 2006). El ciclo más antiguo descrito corresponde al paleolago Ouki hace 98 – 120 mil años atrás, el cual alcanzó una cota de 3740 msnm y tuvo aproximadamente 80 m de profundidad.

El lago Tauca, el más extenso paleolago existente desde el Pleistoceno tardío, fue datado entre 14 y 18 mil años (Fornari *et al.*, 2001; Placzek *et al.*, 2006). Este sistema alcanzó una extensión de 60.000 km² y una profundidad de 140 m llegando a una cota de 3740 msnm (Figura 1) (Placzek *et al.*, 2006). Posteriormente, durante el Holoceno, disminuyó el nivel del agua, fragmentando el ambiente acuático, hecho que sugiere la formación de poblaciones aisladas de las especies confinadas a estos sistemas hidrológicos (Keller & Soto, 1998; Lüssen *et al.*, 2003).

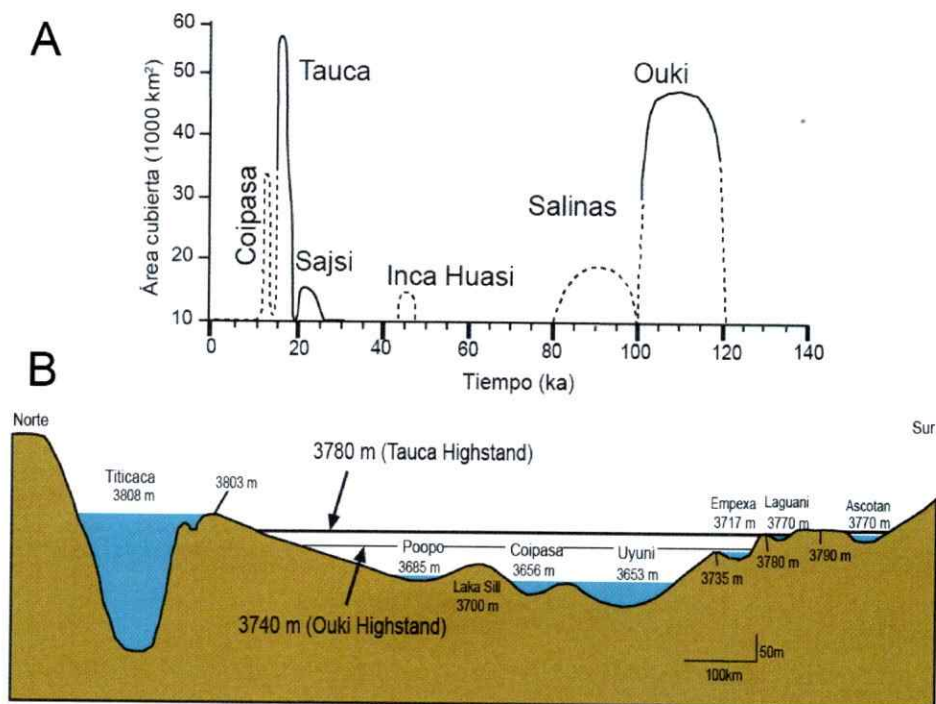


Figura 1. A) Superficie alcanzada durante los últimos 140 mil años por diferentes ciclos lacustres. Es importante notar que los períodos en los que existieron paleolagos (fases húmedas) son mucho más cortos que los eventos secos. **B)** Perfil Norte-Sur del Altiplano. Se indica la altitud alcanzada por los dos grandes ciclos lacustres, Ouki y Tauca (modificado de Placzek *et al.*, 2006).

En una de las cuencas endorreicas en la zona central del Altiplano chileno se encuentra el salar de Ascotán (Región de Antofagasta, Chile) (Figura 2). El salar está ubicado entre los 21,2 y 21,4°S, a 3760 msnm, abarca aproximadamente 33 km de largo por 16 km de ancho en su máxima amplitud, presenta una superficie cubierta principalmente por depósitos evaporíticos (243 km²) y el agua superficial (18 km²) es provista por una serie de vertientes ubicadas en el margen oriental del sistema. El agua existente en las vertientes del salar de Ascotán proviene de la Caldera Pastos Grandes ubicada en Bolivia a 4600 msnm, ambos sistemas se unen mediante conexiones subterráneas (Keller & Soto, 1998; Risacher *et al.*, 1999, 2003).

Para los organismos estrictamente acuáticos del salar, como es el caso del gasterópodo *Heleobia ascotanensis* (Courty, 1907), la fragmentación del hábitat probablemente estimuló la diferenciación de las poblaciones, como resultado que su hábitat quedó aislado por barreras terrestres que impiden su dispersión, restringiendo o disminuyendo el flujo génico. En sistemas hidrológicos similares, se ha sugerido que para gasterópodos de agua dulce del género *Mexipyrgus* Taylor, 1966 el aislamiento de las cuencas de residencia produciría una considerable diferenciación genética (Johnson, 2005). Además, se ha propuesto que, en este tipo de sistemas, si entre alguno de estos ambientes existiese una mayor dispersión (o conectividad) que otros, la escala espacial de la diferenciación genética podría variar entre localidades (Bousset *et al.*, 2004).

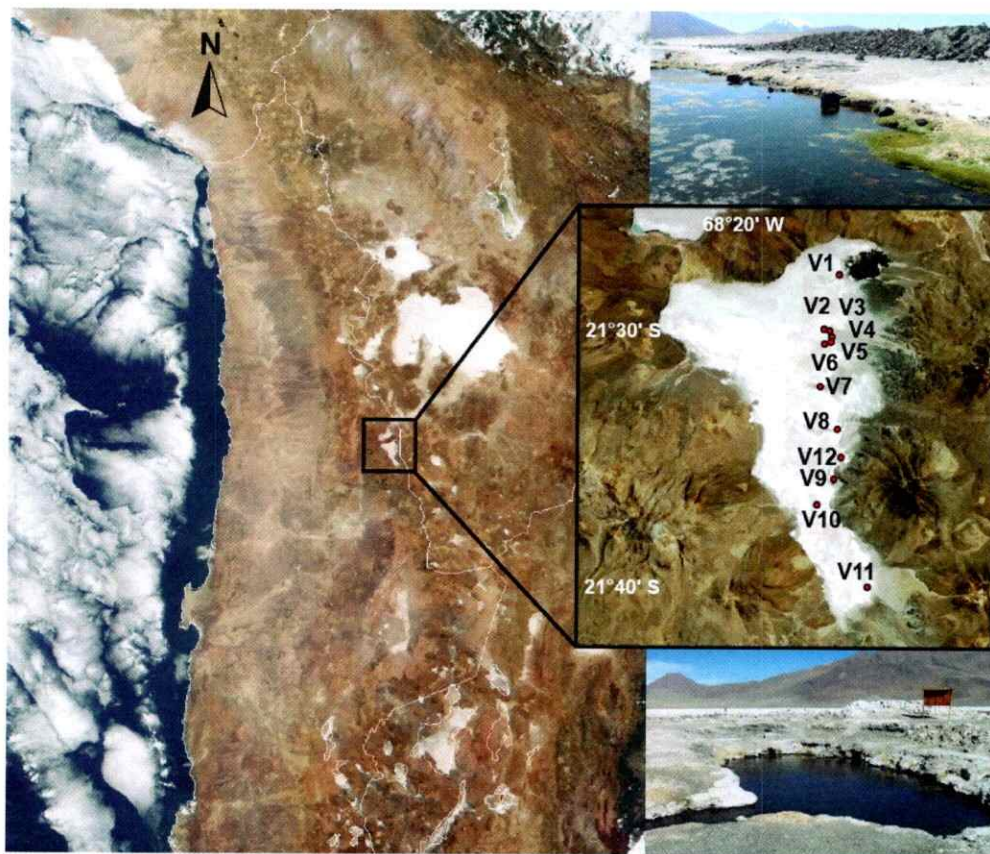


Figura 2. Imagen satelital del salar de Ascotán. En el recuadro se indican las 12 vertientes que componen el sistema. Además se muestran fotografías de las vertientes 2 y 11 (arriba y abajo, respectivamente).

El género *Heleobia*, Stimpson 1865 presenta una distribución que se extiende por todo el Cono Sur de Sudamérica (Figura 3). *Heleobia ascotanensis* es un caracol branquiado que presenta opérculo y es estrictamente acuático, por tanto su distribución dentro del salar se encuentra restringida a las vertientes que componen los únicos cuerpos de agua dentro del sistema. Su capacidad de dispersión guarda una estrecha relación con las propiedades

biológicas de la especie, ya que se ha sugerido que las especies de gasterópodos que presentan opérculo poseen una resistencia a la desecación mayor que los que no lo poseen (Alonso & Castro-Díez, 2008; Richards & Arrington, 2008; van Leeuwen *et al.*, 2012).

En el salar de Ascotán se ha descrito la presencia de la especie *Heleobia ascotanensis* (Courty, 1907) y cinco subespecies (Courty, 1907; Collado & Méndez, 2012). Las vertientes del salar se encuentran aisladas de otras por extensas zonas de terrenos evaporíticos que conforman barreras topográficas teóricamente infranqueables para los gasterópodos, lo que podría reducir la conectividad entre las vegas (eventualmente reduciendo el flujo genético entre las poblaciones de las vertientes).

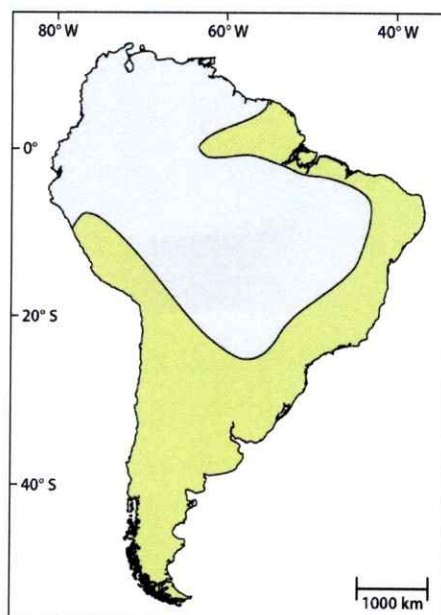


Figura 3. Distribución (en verde) del género *Heleobia* en Sudamérica (modificado de Hershler y Thompson, 1992).

Al interior del salar de Ascotán se han realizado estudios filogeográficos en taxa co-distribuidos con *H. ascotanensis*. En *Orestias ascotanensis* Parenti, 1984, un pez endémico del salar (Keller & Soto, 1998; Vila *et al.*, 2006) que habita vertientes de agua dulce aisladas probablemente hace 11.000 años (Morales *et al.*, 2011), diferentes poblaciones fueron analizadas genéticamente utilizando la región control del DNA mitocondrial, revelando estructuración genética al interior del salar y una pérdida de la diversidad genética entre las poblaciones más aisladas, probablemente siendo una consecuencia de la fragmentación post-pleistocénica que ocurrió en el sistema (Morales *et al.*, 2011). En *O. ascotanensis* la mayoría de las unidades genéticas presentes en el salar presentaron una alta diversidad genética, representada por la red de haplotipos de la especie (Figura 4). Adicionalmente, se encontró que en las vertientes 1 y 11, las cuales se encuentran aisladas geográficamente de las vertientes centrales, contienen poblaciones que presentan haplotipos únicos. Los tres haplogrupos restantes ocurren en las vertientes centrales del salar y están compartidos entre las vertientes 2 a 10 (Morales *et al.*, 2011). Los resultados indican una estructura genética al interior del salar, lo que revela alta conectividad entre las vertientes centrales y cierto aislamiento con las vertientes más septentrionales y meridionales del sistema.

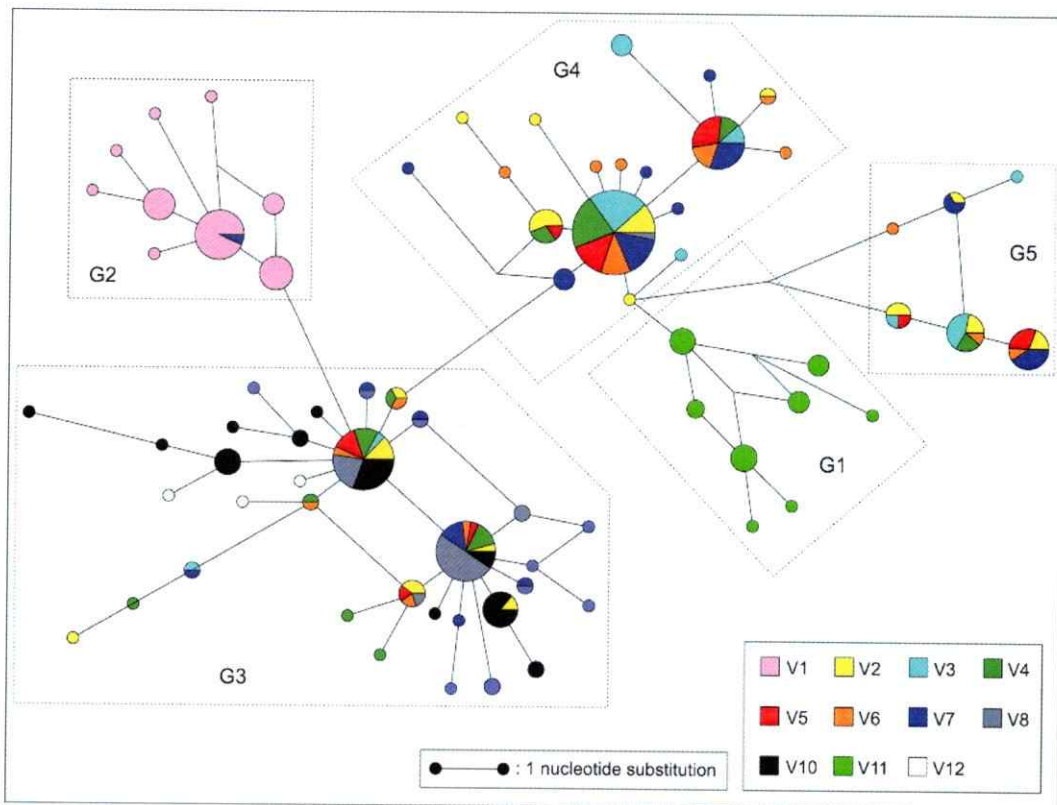


Figura 4. Rede de haplotipos obtida utilizando sequências de la región control (*D-Loop*) del mtDNA de *Orestias ascotanensis* provenientes del salar de Ascotán (Morales *et al.*, 2011).

La estructura genética de *O. ascotanensis* sugiere un aislamiento temprano de las vertientes 1 y 11, probablemente relacionado con la última transición de un período húmedo a un período árido en el Altiplano ocurrido hace aproximadamente 11.000 años (Morales *et al.*, 2011).

Un patrón similar presenta otro organismo residente en el salar de Ascotán, el gasterópodo *Biomphalaria crequii* (Courty, 1907). Este caracol pulmonado también fue estudiado desde una aproximación molecular, usando

el gen *COI* del mtDNA, junto a gasterópodos del género *Biomphalaria* Preston, 1919 del contiguo salar de Carcote. El análisis bayesiano realizado en GENELAND para *Biomphalaria* identificó cuatro clusters genéticos de estos gasterópodos en ambos salares (Figura 5). Un cluster estuvo representado por secuencias de gasterópodos recolectados en la Vertiente 1 del salar de Carcote. Un segundo cluster incluyó secuencias de gasterópodos recolectados en las vertientes 2 y 3 del mismo salar más las vertientes 2 a 8 del salar de Ascotán. Un tercer cluster fue representado por secuencias de las vertientes 9 y 10 del salar de Ascotán, y el último cluster contenía únicamente las secuencias de la Vertiente 11 de este salar (Collado & Méndez, 2013).

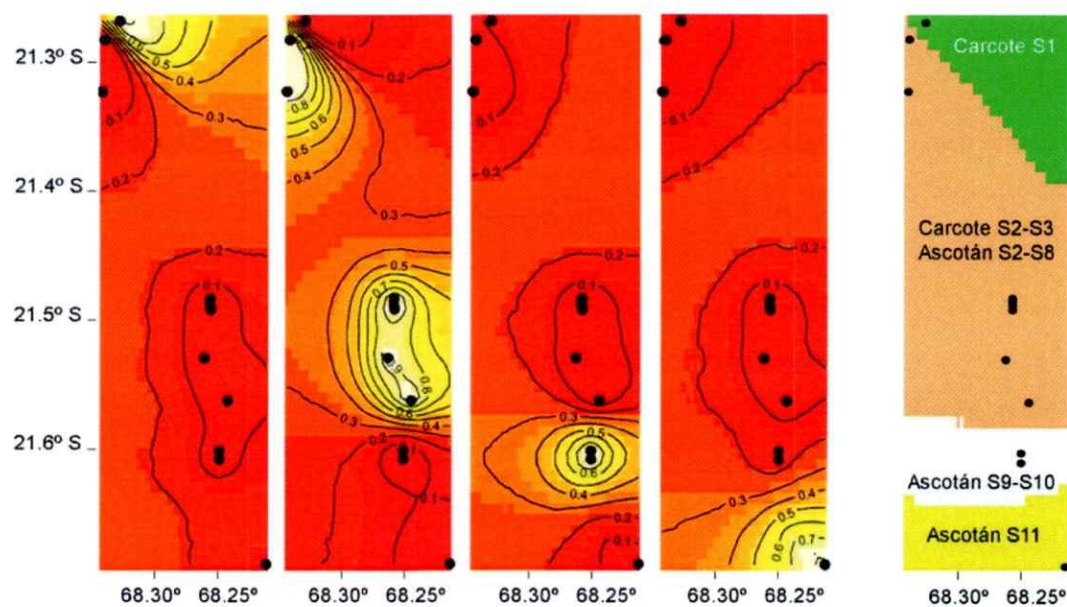


Figura 5. Estructura genética espacial obtenida en GENELAND para poblaciones de *Biomphalaria* de los salares de Carcote y Ascotán (las vertientes analizadas están denotadas por S1, S2, S3, etc., en inglés spring) (Collado & Méndez, 2013).

Variación genética y morfológica de *Heleobia* en el salar de Ascotán

Collado *et al.* (2013) utilizando secuencias de mtDNA (12S y 16S), realizaron una reconstrucción filogenética que incluyó diferentes poblaciones y especies de *Heleobia* del norte de Chile. A partir de estos resultados se infirió que las poblaciones de *Heleobia* que habitan el salar de Ascotán se encuentran diferenciadas genéticamente del resto de las poblaciones altiplánicas y que además dentro del salar existiría estructuración genética (Collado *et al.*, 2013).

Adicionalmente, se detectó un fenómeno biológico interesante en gasterópodos de *H. ascotanensis*; individuos provenientes de diferentes vegas del salar presentaban diferencias en forma y tamaño de la concha observables a simple vista. Este fenómeno se ha reportado en diferentes especies de gasterópodos (Dillon, 1984; Kemp & Bertness, 1984; Haase, 2003; Brönmark *et al.*, 2011) y se han reportado diferentes causas potenciales de la diferenciación morfológica. En *Heleobia australis* (d'Orbigny, 1835) se ha sugerido que el parasitismo por *Microphallus simillimus* Travassos, 1920 causa una disminución en el tamaño de la concha en individuos infectados y esta variación también puede ser modulada por diferentes presiones ambientales (Alda *et al.*, 2010); en *Achantina monodon* (Pallas, 1774), un gasterópodo marino, se ha reportado una asociación entre quiebres biogeográficos y cierto grado de diferenciación genética y morfológica, esta variación fue asociada principalmente a una baja capacidad de dispersión de la especie (Sánchez *et al.*, 2011); tanto en gasterópodos terrestres y acuáticos se han indicado diversas causas posibles

de la variación morfológica de la concha, algunas de ellas son humedad, temperatura, insolación, recursos, competencia intraespecífica, depredación, condiciones ambientales, etc. (Goodfriend, 1986; Chiu *et al.*, 2002; Guerra-Varela *et al.*, 2007).

Los organismos que habitan las vertientes del salar de Ascotán están sometidos a condiciones ambientales extremas y es probable que hayan desarrollado adaptaciones fenotípicas a las condiciones locales, como se ha reportado en *Lithasia* (Haldeman, 1840) (Minton *et al.*, 2008). Además, en vista que existe una extensa distancia geográfica entre algunas de las vertientes, es probable que esta separación espacial tenga una correlación con una discontinuidad genética, dado que la aparición de barreras zoogeográficas o la disminución del flujo genético se ha asociado directamente a la aparición de una estructura genética y, en algunos casos, a una variación fenotípica en diversas especies (Avise *et al.*, 1987; Sánchez *et al.*, 2011). Por lo tanto, en el presente estudio se evaluó la existencia de una variación morfológica entre individuos de diferentes vertientes y que esta variación morfológica tuviese una relación con la variación genética esperada, además se intentó establecer si existe una relación entre la distancia geográfica entre las vertientes y la variación genética entre los individuos del sistema.

Considerando que *H. ascotanensis* se encuentra en 11 de las 12 vertientes del salar de Ascotán (no se ha encontrado en la Vertiente 1), co-distribuida con *Biomphalaria* y *Orestias*, se espera que esta especie presente

una diferenciación genética al interior del sistema y que las poblaciones existentes en las diversas vertientes del salar presenten estructuración genética como consecuencia de la fragmentación del hábitat.

HIPÓTESIS

Antecedente 1

Dado que el salar de Ascotán es un ambiente fragmentado compuesto por vertientes que poseen diferentes niveles de conectividad, y que estudios en *Biomphalaria* y *Orestias*, taxa co-distribuidos con *Heleobia ascotanensis*, revelaron patrones similares de estructuración genética, se espera que:

Hipótesis 1

Las poblaciones de *H. ascotanensis* de las vertientes meridionales del salar de Ascotán presentan una baja conectividad con las vertientes septentrionales del sistema, y que la estructuración genética se relacione con la distancia geográfica entre las vertientes.

Antecedente 2

Dada la variación morfológica de *H. ascotanensis* observada entre individuos de diferentes vertientes del salar de Ascotán, se espera que:

Hipótesis 2

Exista una diferenciación morfológica entre las poblaciones de *H. ascotanensis* presentes en las vertientes del sistema, y que esta variación se relacione con las diferencias genéticas observadas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la existencia de diferenciación genética y morfológica en poblaciones de gasterópodos del género *Heleobia* entre vertientes al interior del salar de Ascotán.

Objetivos específicos

1. Estimar el grado de variación genética entre vertientes mediante análisis moleculares utilizando secuencias del gen *citocromo c oxidasa subunidad I (COI)* del DNA mitocondrial.
2. Determinar el grado de variación morfológica entre vertientes en gasterópodos del género *Heleobia* del salar de Ascotán utilizando análisis morfométricos.
3. Establecer si existe un correlato entre diferencias genéticas, diferencias morfológicas y la distancia geográfica entre las vertientes del salar.



MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Especímenes de *Heleobia ascotanensis* fueron recolectados desde las vertientes 2 a 12 del salar de Ascotán, una cuenca hidrológica del Altiplano sur Andino (Figura 6, Tabla 1). El sistema se encuentra aislado por barreras terrestres y se ubica por sobre los 3700 msnm. Las muestras de gasterópodos fueron recolectadas en abril de 2012 a partir de macrófitas utilizando un cedazo de 1 mm de apertura de malla. Para evaluar las diferencias genéticas entre vertientes se secuenciaron entre 10 y 40 individuos por vega (256 individuos en total para el sistema). Para evaluar las diferencias morfológicas entre vertientes se utilizaron entre 30 y 60 individuos adultos por vertiente (570 individuos en total para el salar).

Los individuos utilizados para los análisis moleculares fueron previamente fotografiados para ser incluidos en los análisis morfométricos. Con el fin de evitar problemas asociados a cambios alométricos durante la ontogenia, en todos los estudios morfométricos se analizaron individuos adultos que se encontraban en el tercio superior de la distribución de tamaño de la muestra recolectada.

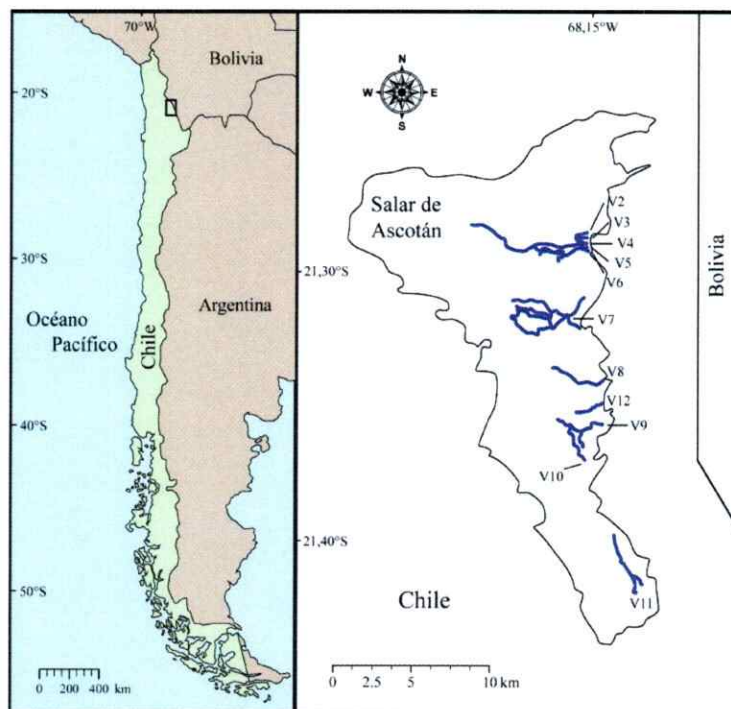


Figura 6. Vertientes analizadas en el salar de Ascotán.

Tabla 1. Coordenadas geográficas de las vertientes analizadas en este estudio.

Vertiente	Latitud; Longitud
V2	21°29'21,20''S; 68°15'24,80''W
V3	21°29'27,80''S; 68°15'25,60''W
V4	21°29'39,80''S; 68°15'25,60''W
V5	21°29'47,20''S; 68°15'24,50''W
V6	21°29'52,80''S; 68°15'24,40''W
V7	21°32'02,70''S; 68°15'40,70''W
V8	21°33'57,20''S; 68°14'36,80''W
V9	21°36'10,40''S; 68°15'00,60''W
V10	21°36'35,00''S; 68°15'00,70''W
V11	21°41'13,90''S; 68°12'54,00''W
V12	21°35'13,90''S; 68°14'32,30''W

Extracción, amplificación y edición de secuencias de DNA

El DNA genómico se extrajo desde especímenes preservados en etanol absoluto usando el método cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) (Winnepenninckx *et al.*, 1993). Para esto se rompió la concha de los animales separándola de las partes blandas, luego el tejido de la branquia y parte del manto fue utilizado para la extracción. Secuencias parciales del gen mitocondrial *citocromo c oxidasa subunidad I (COI)* fueron amplificadas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en al menos 10 especímenes de cada vega utilizando los partidores universales HCO2198 (5'-TAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') y LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG -3') (Folmer *et al.*, 1994), y dos parejas de partidores desarrolladas en el Laboratorio de Genética y Evolución específicamente para esta tesis: HCOmv2 (5'-AAGAATTGGGTCACCACCTC-3') y LCOmv2 (5'-GGAATGTGATCTGGGTTAGT-3'); HCOmv3 (5'-TCCAGCTAAAACAGGGAGG-3') y LCOmv3 (5'-TCGAGCTGAACTAGGACAAC-3'). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 2 min a 94 °C, 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 40 °C por 30 s y 75 °C por 45 s, con una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos amplificados fueron analizados en el servicio de secuenciación MacroGen Inc., Seúl, Corea. Las secuencias fueron editadas y alineadas mediante inspección visual utilizando el programa BioEdit (Hall, 1999).

Análisis moleculares

En el programa DnaSP (Librado & Rozas, 2009), se calcularon los siguientes índices de diversidad genética: i) Número de sitios polimórficos (S); ii) Número de haplotipos (K); iii) Diversidad haplotípica (H) y iv) Promedio de diferencias por par de secuencias (Π).

Las relaciones entre los haplotipos fueron visualizadas en el programa NETWORK (Bandelt *et al.*, 1999) construyendo una red de haplotipos mediante el algoritmo median-joining. La red obtenida informa gráficamente las relaciones genealógicas encontradas, donde cada círculo reconstruido representa un haplotipo diferente, el tamaño de éste correspondiendo a su frecuencia dentro de la muestra y la distancia que separa estos haplotipos corresponde al número de pasos mutacionales que hay entre ellos.

Posteriormente, para examinar la diferenciación entre cada par de vertientes, se realizó un test de F_{ST} pareado con el programa ARLEQUIN (Excoffier *et al.*, 2005). Este test pone a prueba la hipótesis nula de ausencia de diferenciación genética entre dos grupos de poblaciones, sobre la base de las diferencias entre pares de secuencias. El rango de este índice se extiende entre cero y uno, es decir: $0 < F_{ST} < 1$. Un valor de $F_{ST} = 0$ indica que los grupos son genéticamente iguales, mientras que $F_{ST} = 1$ indica que los grupos están completamente diferenciados. La significancia de cada índice F_{ST} pareado se obtuvo permutando 10.000 veces los haplotipos entre poblaciones entre grupos (nivel de significancia, $\alpha = 0,05$).

Número de grupos genéticos

Para determinar el número de grupos genéticos y la estructura poblacional espacial se realizó un análisis en GENELAND (Guillot *et al.*, 2005). Este análisis utiliza una aproximación bayesiana de cadena de Markov Monte Carlo basada en modelos estadísticos espaciales que consideran sitios polimórficos y las coordenadas geográficas de los individuos muestreados para agruparlos en grupos genéticos (clusters) o poblaciones. Los análisis realizados consideraron tanto el modelo correlacionado y no correlacionado de frecuencias. En ambas aproximaciones se utilizaron los parámetros detallados a continuación: en primer lugar se identificó el número más probable de clusters (CT) realizando cinco corridas MCMC independientes de 10^8 iteraciones cada una y un muestreo (thinning, en inglés) cada 1000 iteraciones, el rango se acotó entre CT=1 a CT=11 (total de vertientes analizadas). Para verificar la consistencia del resultado obtenido, se realizaron 15 corridas independientes de 10^8 iteraciones cada una y un thinning de 1000 con el número de clusters acotado a CT=3 y CT=4.

Análisis morfométricos

Dado que *H. ascotanensis* no presenta dimorfismo sexual, para los análisis se utilizaron machos y hembras. La concha de cada espécimen fue fotografiada desde una vista ventral del cuerpo, utilizando una cámara digital Moticam 2000 adaptada a una lupa estereoscópica. Las diferencias morfológicas se evaluaron utilizando morfometría geométrica desde dos aproximaciones. El análisis de

morfometría geométrica de landmarks consideró catorce puntos (10 landmarks y 4 semi-landmarks) para cada fotografía; en estos análisis se utilizó el programa tps DIG versión 2.16 (Rohlf, 2010). Los landmarks se seleccionaron de manera que estos fuesen descriptores adecuados de la variación de la forma de la concha (incluido el peristoma o abertura de la concha) (Figura 7). La variación asociada a la forma se extrajo mediante el método Full Procrustes Fit (Dryden & Mardia, 1998) implementado en el programa MorphoJ 1.03b (Klingenberg, 2011). Esta aproximación metodológica permitió estimar la forma promedio y explorar la variación de ésta en el set de datos (Dryden & Mardia, 1998). Para evaluar la variabilidad en la morfología de la concha se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con los valores obtenidos del Full Procrustes Fit (Relative Warps) en el programa MorphoJ 1.03b (Klingenberg, 2011). Posteriormente se realizó un MANOVA. Finalmente para determinar si los individuos podían ser correctamente asignados a cada grupo morfológico se realizó un análisis de función discriminante (DA) en el programa SYSTAT (SYSTAT, 2000).

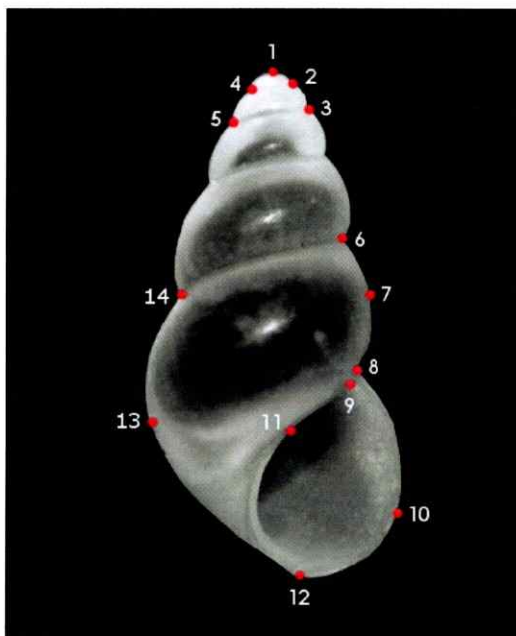


Figura 7. Se indican los landmarks (1 – 14) evaluados en el estudio morfológico para describir la forma promedio de la concha de *Heleobia ascotanensis*.

La segunda aproximación correspondió a la morfometría geométrica de contorno. Este análisis se ha utilizado con éxito en gasterópodos y otros grupos en los cuales es difícil establecer hitos morfológicos (Zahn & Roskies, 1972; Hariri & Bachnou, 2004; Yoshioka *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2012), principalmente dado que las formas biológicas en gasterópodos son complejas. Además, se ha documentado que el análisis de contorno captura una mayor proporción de la información morfológica que los métodos biométricos basados en mediciones lineares y angulares. El análisis de contorno utilizando descriptores elípticos de Fourier (EFDs, por sus siglas en inglés) puede delinear cualquier forma de un contorno cerrado bi-dimensional. La normalización

matemática de los EFDs implica que son invariantes con respecto a la escala, rotación o localización y posición de inicio de la codificación de la cadena que da cuenta del contorno.

Mediante este análisis se evaluó la variación en la forma de la concha entre los gasterópodos del género *Heleobia* distribuidos en el salar de Ascotán. Los contornos se dibujaron a partir de las fotografías utilizadas en la morfometría geométrica de landmarks usando el programa Adobe Photoshop CS6. Las transformaciones de los elípticos de Fourier se realizaron en el programa SHAPE (Iwata & Ukai, 2002). Para evaluar la variabilidad en la morfología de la concha se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) en el módulo PrinComp del paquete SHAPE (Iwata & Ukai, 2002). Posteriormente se realizó un MANOVA y para determinar si los individuos podían ser correctamente asignados a cada una de las localidades se realizó un análisis de discriminante lineal (SYSTAT, 2000), el cual maximiza la discriminación entre los grupos usando combinaciones lineales de variables.

Para los análisis morfológicos se construyeron los siguientes sets de datos:

Morfometría geométrica de landmarks:

(i) Para evaluar la variación morfológica entre vertientes en el análisis geométrico de landmarks y con el fin de evitar problemas relacionados con la variación en el número de vueltas y cambios espaciales en la posición de los

hitos morfológicos, se utilizó un submuestreo con 255 individuos. Este set de datos contenía individuos de las once vertientes del estudio.

Morfometría geométrica de contornos:

(ii) Para evaluar la variación morfológica entre vertientes el análisis de contorno se hizo en base a 570 individuos, los cuales fueron clasificados de acuerdo a las vertientes de procedencia.

(iii) Para evaluar una posible asociación entre variación morfológica y genética se realizó un análisis estadístico utilizando los 256 individuos secuenciados. Los grupos se clasificaron de acuerdo a la variación genética (clusters obtenidos de GENELAND) emanados a partir del estudio genético.

Relación entre las distancias genéticas, morfológicas y geográficas

Con el fin de evaluar la correlación entre las distancias genéticas, morfológicas y geográficas se realizó una prueba de Mantel, mediante la cual se analizó la significancia de correlaciones entre matrices: (a) de distancia genética (F_{ST}), (b) la matriz morfológica de distancias morfométricas de los grupos existentes en el salar (distancias de Mahalanobis obtenidas de la morfometría geométrica de landmarks), y (c) la matriz de distancia geográfica entre los grupos de *Heleobia* al interior del salar de Ascotán. Los valores de F_{ST} se calcularon usando el programa ARLEQUIN (Excoffier *et al.*, 2005), y las pruebas de Mantel se realizaron en el software PAST (Hammer *et al.*, 2001).

RESULTADOS

Se recolectaron 570 individuos de 11 de las 12 vertientes del salar de Ascotán (no se encontró *H. ascotanensis* en la Vertiente 1 del salar), los que fueron analizadas morfológicamente. De estas muestras se secuenciaron 256 individuos. Los tamaños muestrales y vertientes de procedencia se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Tamaños muestrales de *Heleobia ascotanensis* utilizados para el estudio morfológico y molecular.

Vertiente	Análisis morfológico	Análisis molecular
V2	60	41
V3	60	23
V4	60	27
V5	60	24
V6	60	25
V7	60	24
V8	60	24
V9	30	13
V10	60	24
V11	30	16
V12	30	15
Total	570	256

Análisis molecular

La amplificación del gen *COI* produjo un fragmento de 591 nucleótidos. La composición nucleotídica considerando todas las secuencias fue A: 23,8%, C: 17,2%, T: 39,7% y G: 19,3%

En la Tabla 3 se muestran los valores de los índices de diversidad genética: el número de sitios polimórficos (S), el número de haplotipos (K), la diversidad haplotípica (H) y el promedio de diferencias entre par de secuencias (Π). Estos índices se calcularon agrupando los individuos por vertiente de origen. Los resultados muestran que:

i) el número de sitios polimórficos por vertiente varió entre 3 y 14, para el salar en total fueron 22.

ii) el número de haplotipos encontrados por vertiente varió entre 3 y 6, para el salar en total fueron 23. Dado que los distintos tamaños muestrales afectan los valores de diversidad, se realizó un remuestreo mediante rarefacción ($n = 13$) para comparar la diversidad genética (en este caso K, número de haplotipos) entre los sitios. El número de haplotipos obtenidos en de las vertientes del salar varió entre $2,54 \pm 0,50$ y $4,62 \pm 0,533$.

iii) la diversidad haplotípica varió entre 0,56 y 0,75 en las vertientes del salar de Ascotán, y para el salar en su totalidad la diversidad correspondió a 0,80.

iv) el promedio de diferencias entre par de secuencias varió entre 0,69 y 5,33 en las vertientes, y fue de 2,78 para todo el salar.

Tabla 3. Índices de diversidad genética de las vertientes del salar de Ascotán. * Las rarefacciones se realizaron con $n = 13$.

Vertiente	Tamaño muestral (N)	N° sitios polimórficos (S)	N° haplotipos (K)	Diversidad haplotípica (H)	Promedio de diferencias por par de secuencias (Π)	Rarefacción*: Promedio N° de haplotipos	Rarefacción*: Desv. Est. N° de haplotipos
2	41	11	5	0,659	4,949	3,6536	0,7606
3	23	12	5	0,723	4,285	4,1209	0,6872
4	27	14	6	0,692	5,328	4,6219	0,8148
5	24	10	4	0,634	5,199	3,3424	0,6231
6	25	10	4	0,657	5,120	3,4243	0,5679
7	24	5	3	0,562	0,855	2,5417	0,4983
8	24	6	4	0,511	0,848	3,0799	0,6898
9	13	6	3	0,564	1,231	3,0000	0,0000
10	24	4	5	0,634	0,815	4,2298	0,6741
11	16	4	5	0,750	1,233	4,6232	0,5337
12	15	3	4	0,600	0,686	3,7333	0,4633
Total	256	22	23	0,804	2,778		

La menor variabilidad genética se encontró en las vertientes 7 y 9 donde se observaron 3 haplotipos, por el contrario la mayor variabilidad se encontró en la Vertiente 4, que presentó 6 haplotipos.

Posteriormente, se construyó la red de haplotipos (Figura 8), en la cual los distintos colores representan las vertientes de origen de los individuos muestreados.

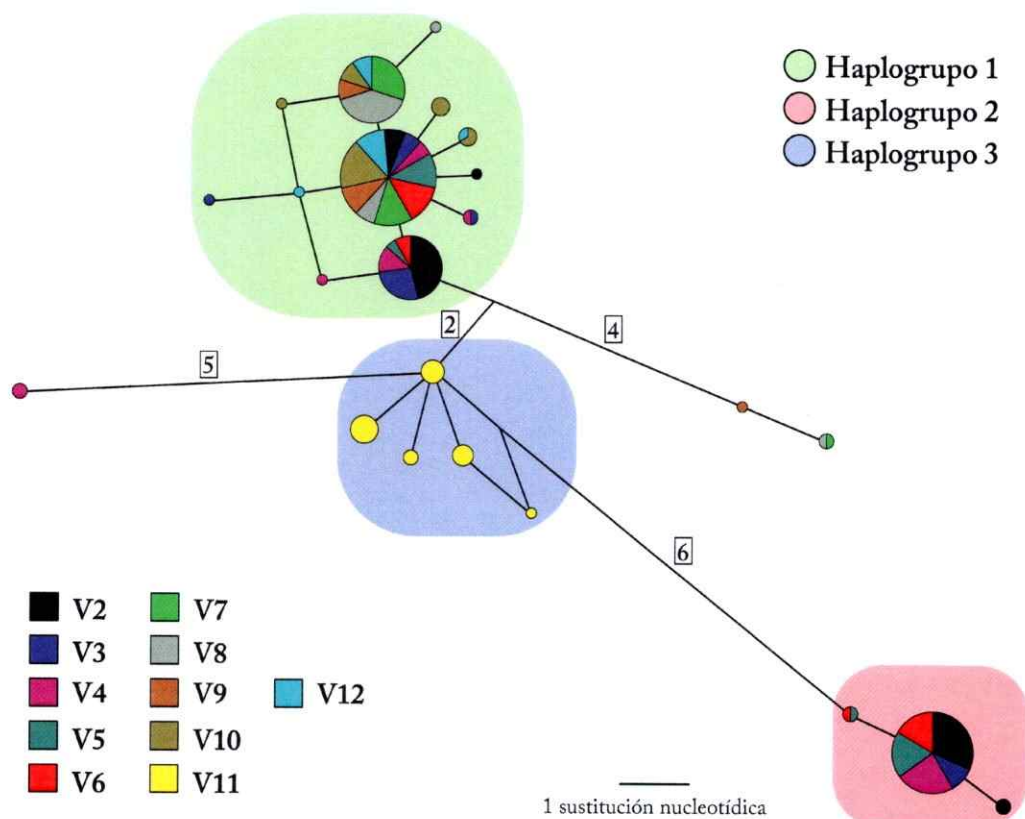


Figura 8. Red de haplotipos de *Heleobia ascotanensis* del salar de Ascotán. Los números sobre las líneas representan el número de pasos mutacionales.

Se observó que dentro del salar existen tres grupos de haplotipos separados que corresponden a vertientes o grupos de vertientes. La red mostró que muchos de los haplotipos son compartidos entre diferentes vertientes, a excepción de los haplotipos que ocurren en la Vertiente 11 (extremo sur del salar) que conforman haplotipos únicos asociados a esta vega. El despliegue de los haplotipos recuperó tres haplogrupos, uno correspondiente a las vertientes 2 a 10 y 12 (Haplogrupo 1), separado por tres pasos mutacionales del Haplogrupo 3 que contiene el haplotipo único de la V11, separado por seis pasos mutacionales del Haplogrupo 3, y separado por dos pasos mutacionales del Haplogrupo 2 (vertientes 2 a la 6).

Distribución geográfica de la diversidad genética

Para analizar la existencia de diferencias genéticas significativas entre pares de vertientes, se realizó un test de F_{ST} pareado. En la Tabla 4, bajo la diagonal principal, se indican los valores de F_{ST} entre vertientes y los valores de p (probabilidad de equivocarse al rechazar la hipótesis nula) se ubicaron sobre la diagonal. Las celdas destacadas correspondieron a los valores de F_{ST} significativos.

Entre las vertientes 2 a la 6 no se detectaron diferencias significativas y todos los valores fueron bajos, indicando que podrían conformar un grupo separado del resto las vertientes del salar. Resultados similares se obtuvo al realizar las comparaciones entre las vertiente 7 a 10 y 12, ya que estas vertientes presentan valores de F_{ST} bajos entre ellas, sin embargo los valores

aumentaron al compararlas con las vertientes que se encuentran hacia el norte del sistema (V2 a V6). Por último, la Vertiente 11 presentó valores de F_{ST} significativos y relativamente altos con las vertientes del norte (0,36 – 0,40), y diferencias muy altas con las vertientes del centro del salar (0,71 – 0,78).

Con esta prueba se corroboraron algunas observaciones obtenidas a partir de la red de haplotipos. La Vertiente 11 del salar de Ascotán se diferenció de todas las otras vertientes del salar y formaría un grupo genéticamente diferenciado del resto. Además existiría un grupo compuesto por las vertientes más septentrionales del salar (V2 a V6), y otro grupo compuesto por las vertientes ubicadas en el centro del salar (V7 a V10 y V12).

Tabla 4. Valores de F_{ST} entre cada par de vertientes y los valores de significancia (bajo y sobre la diagonal, respectivamente).

	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12
V2		0,063 ± 0,008	0,511 ± 0,016	0,452 ± 0,016	0,345 ± 0,012	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,000
V3	0,066		0,042 ± 0,009	0,128 ± 0,010	0,223 ± 0,014	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,013 ± 0,003	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
V4	0	0,113		0,480 ± 0,015	0,251 ± 0,014	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
V5	0	0,058	0		0,784 ± 0,011	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
V6	0	0,018	0,006	0		0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,002 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
V7	0,467	0,331	0,526	0,466	0,411		0,393 ± 0,013	0,409 ± 0,011	0,020 ± 0,006	0,000 ± 0,000	0,129 ± 0,009
V8	0,484	0,369	0,540	0,485	0,435	0,0112		0,058 ± 0,007	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,007 ± 0,003
V9	0,392	0,221	0,441	0,373	0,316	0	0,105		0,308 ± 0,015	0,000 ± 0,000	0,836 ± 0,011
V10	0,456	0,301	0,518	0,453	0,395	0,089	0,230	0,007		0,000 ± 0,000	0,756 ± 0,015
V11	0,367	0,366	0,397	0,400	0,378	0,773	0,786	0,711	0,771		0,000 ± 0,000
V12	0,424	0,265	0,478	0,411	0,355	0,033	0,178	0	0	0,773	

En color se indican los valores de F_{ST} significativos y el respectivo valor de significancia.

GENELAND

El análisis se realizó utilizando el modelo de frecuencias correlacionado y no correlacionado. Para ambos modelos se obtuvieron probabilidades posteriores de 0,65 indicando la existencia de tres grupos genéticos (se indican los valores obtenidos de la aproximación utilizando el modelo correlacionado).

Los resultados del análisis indicaron que el número de poblaciones más probable al interior del salar sería tres (probabilidad posterior = 0,65) (Figura 9). El primer grupo estaría compuesto por las vertientes 2 a 6, vertientes ubicadas en el norte del salar. El segundo cluster corresponde a las vertientes del centro del sistema, este grupo reúne las vertientes 7 a 10 y la Vertiente 12. Y el último grupo contiene solamente a la Vertiente 11, ubicada en el extremo sur del salar. Los resultados en la prueba bayesiana corroboraron lo obtenido al calcular las diferencias genéticas (F_{ST} pareado), sugiriendo que existen tres grupos genéticos al interior del salar.



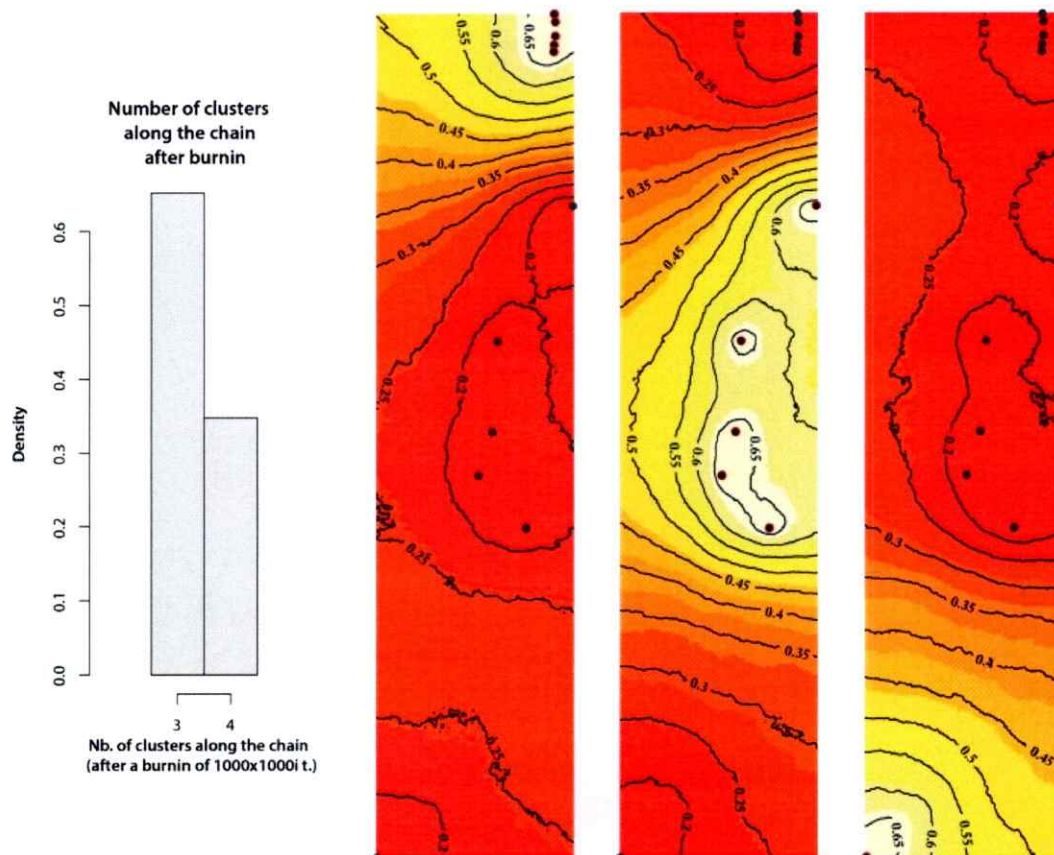


Figura 9. Estructura genética espacial obtenida en GENELAND para *Heleobia ascotanensis* del salar de Ascotán (los puntos negros indican las vertientes posicionadas geográficamente al interior del sistema). **A** Número de clusters estimados para el salar. **B** Probabilidades posteriores de pertenecer a uno de los cluster 1 a 3 (de izquierda a derecha, respectivamente). Colores más claros indican mayores probabilidades de ser miembro de la población.

Análisis morfológicos

Para la aproximación en base a morfometría geométrica de landmarks se utilizó un submuestreo de individuos. Dado que algunos de las muestras presentaron diferentes números de vueltas de la concha y esta variación afecta el cambio espacial de la posición de los landmarks, el submuestreo consistió en un set de datos que incluyó a 255 individuos. Este submuestreo se realizó con individuos de todas vertientes del salar en las cuales se encontró *H. ascotanensis*. En el caso de la morfometría geométrica de contorno se utilizó la totalidad de los individuos (570), ya que la variación local (asociada a cada individuo) es evaluada en el análisis en completitud.

Morfometría geométrica de landmarks

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés) para observar la posición en el espacio multivariado de los individuos muestreados categorizados de acuerdo a la vertiente de origen. En el PCA, la primera componente principal (PC1) acumuló el 44% de la varianza y al observar la grilla de deformación se pudo apreciar que la variación asociada a este eje se relacionó con el cambio de posición de los hitos asociados al margen lateral de la concha, dando cuenta de cambios en el ancho a lo largo del eje. Por otro lado, la segunda componente acumuló el 13,8% de la varianza, y los cambios asociados a esta componente observables en la grilla de deformación dan cuenta de cambios en la posición del peristoma y cambios del tamaño de éste. El PCA mostró una

sobreposición casi completa de las muestras provenientes de las diferentes vertientes del salar, indicando que no existe una diferenciación morfológica evidente entre algunas de las vegas (Figura 10). El MANOVA realizado indicó que existen diferencias significativas (Wilk's $\lambda = 0,029$; g.l. = 240, 2062; $p < 0,0001$), sin embargo al realizar el análisis discriminante (jackknife) los valores de clasificación correcta asociados a cada vertiente fueron bajos, a excepción de las vertientes 4, 9, 10 y 11 (64%, 64%, 60% y 75%, respectivamente).

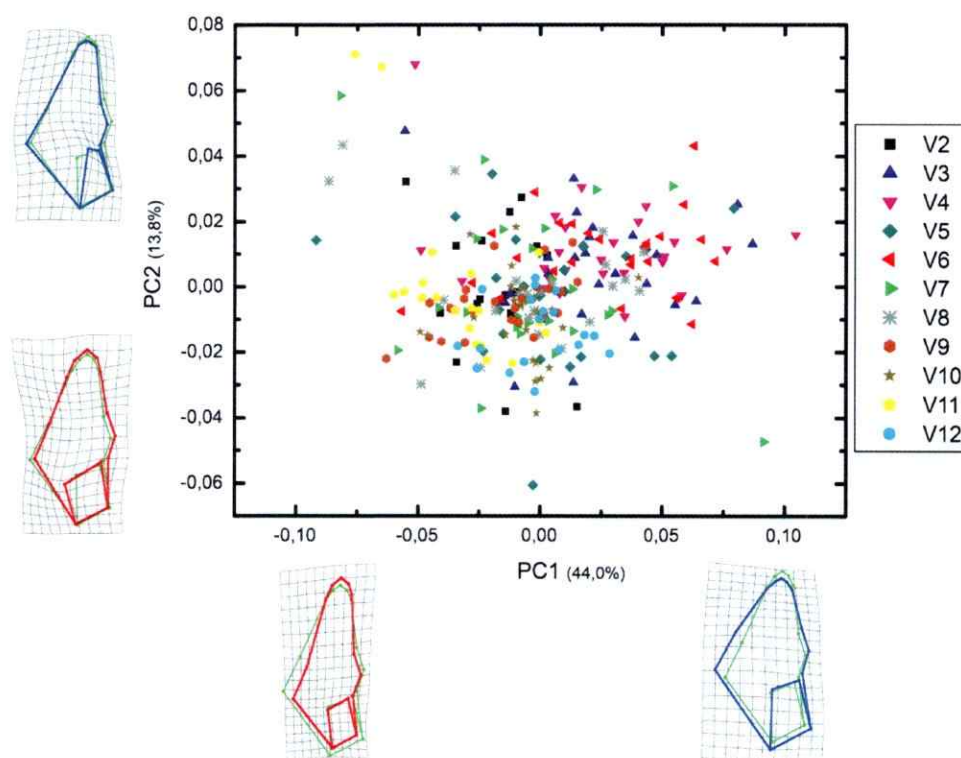


Figura 10. PCA utilizando como clasificador las vertientes de procedencia de *Heleobia ascotanensis* del salar de Ascotán. Se muestran las grillas de deformación que indican la variación en el primer y segundo componente (abajo y a la izquierda, respectivamente).

Morfometría geométrica de contorno

El análisis se realizó utilizando 570 individuos, el número de armónicos utilizados se decidió en base a una inspección visual, y se determinó que 30 armónicos representaban de forma adecuada el contorno de las conchas utilizadas en el estudio (Figura 11).

El análisis de componentes principales de los individuos clasificados por vertiente de origen mostró una sobreposición en el espacio morfológico, y al realizar el MANOVA, este mostró diferencias significativas (Wilk's $\lambda = 0,230$; g.l. = 120, 4267; $p < 0,0001$) (Figura 12), sin embargo el análisis discriminante (usando el método jackknife) arrojó valores de clasificación correcta bajo el 45% para todas las vertientes, a excepción de la Vertiente 11 (65%) y Vertiente 6 (60%).

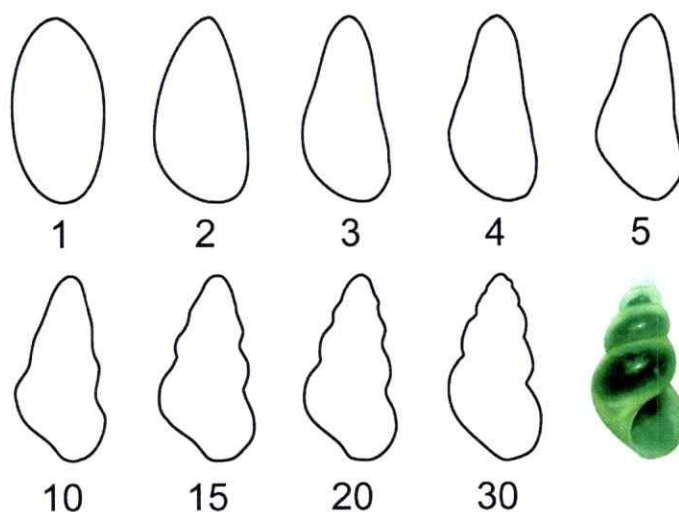


Figura 11. Reconstrucciones del contorno de *Heleobia ascotanensis*, con número de armónicos en incremento.

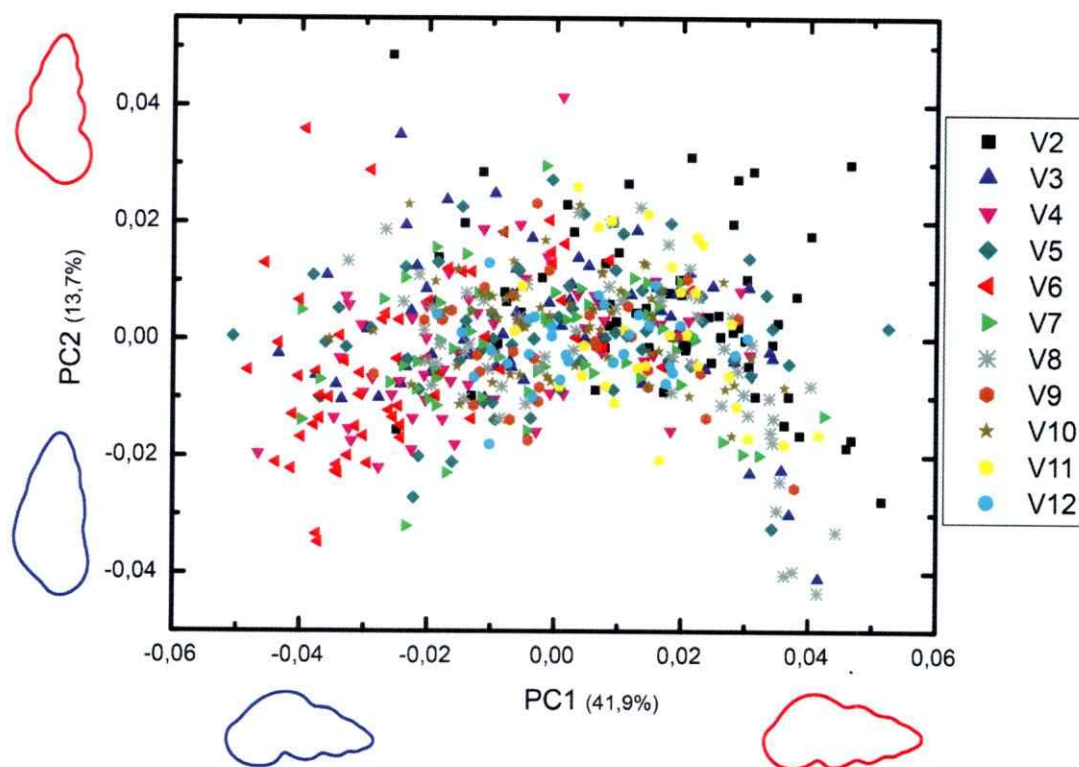


Figura 12. PCA clasificando los individuos de *Heleobia ascotanensis* del salar de Ascotán de acuerdo a vertiente de procedencia. En los márgenes del gráfico se muestran la variación de la concha en la primera y segunda componente (abajo y a la izquierda, respectivamente), mediante la reconstrucción de los contornos.

Posteriormente, los 256 individuos secuenciados fueron clasificados en tres clusters (1, 2 y 3, obtenidos del análisis GENELAND) de acuerdo a los resultados obtenidos en los estudios moleculares, y estos individuos fueron analizados morfométricamente utilizando las reconstrucciones de contorno. El PCA (Figura 13) mostró una sobreposición importante entre los tres grupos, y si bien el

MANOVA indicó diferencias significativas (Wilk's $\lambda = 0,838$; g.l. = 14, 468; $p = 0,0001$), los porcentajes de clasificación correcta obtenidos mediante el análisis discriminante indicaron que no existe una variación morfológica que permita clasificar los grupos morfológicos en base a las diferencias genéticas (para los tres grupos los porcentajes fueron bajo 20%).

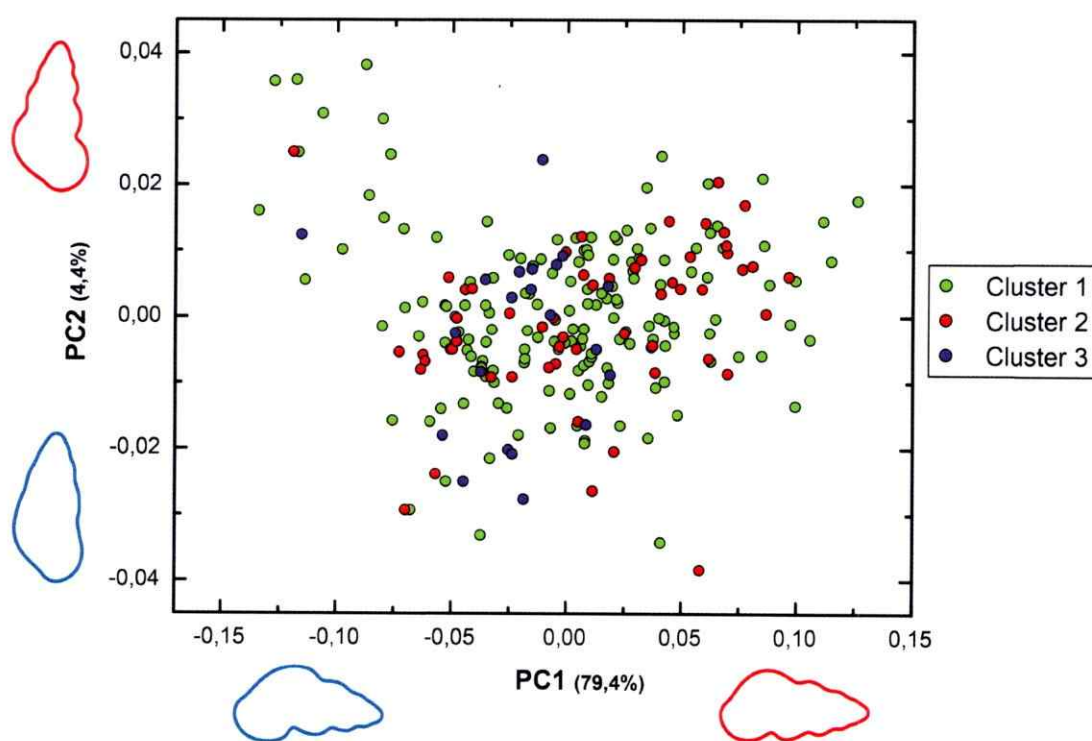


Figura 13. PCA usando como clasificador los haplogrupos de *Heleobia ascotanensis* del salar de Ascotán obtenidos en los análisis moleculares. En los márgenes del gráfico se muestran la variación de la concha en la primera y segunda componente (abajo y a la izquierda, respectivamente), mediante la reconstrucción de los contornos.

Relación entre las distancias genéticas, distancias geográficas y distancias morfológicas

Se realizaron tres pruebas de Mantel, mediante las cuales se analizaron las significancias de correlaciones entre diferentes matrices:

(i) distancias geográficas entre vertientes (en metros) y distancias genéticas (F_{ST}): el resultado del test de Mantel entregó un coeficiente de correlación de Mantel, $r = 0,6052$ ($p = 0,0026$). El resultado indica que existe una relación directamente proporcional entre distancia geográfica (metros) y distancia genética (valores de F_{ST}) (Figura 14). Este resultado concuerda con lo obtenido por la aproximación bayesiana realizada en GENELAND.

(ii) distancias geográficas y distancias morfológicas (distancias de Mahalanobis obtenidas desde la morfometría de landmarks): el resultado del test de Mantel no resultó significativo y entregó un coeficiente de correlación de Mantel bajo, $r = 0,1308$ ($p = 0,125$). El resultado indica que no existe correlación entre las distancias geográficas y las distancias morfológicas. Esto era esperable dado que no existe una diferenciación morfológica entre las vertientes (a excepción de la variación que existe entre la Vertiente 11 y el resto de las vegas).

(iii) distancias genéticas (F_{ST}) y distancias morfológicas (distancias de Mahalanobis): el resultado del test de Mantel entregó un coeficiente de correlación bajo y no significativo, $r = 0,1191$ ($p = 0,167$). Los valores obtenidos indican que no

existe correlación entre las distancias genéticas y las distancias morfológicas encontradas entre los individuos analizados de las vertientes del salar de Ascotán.

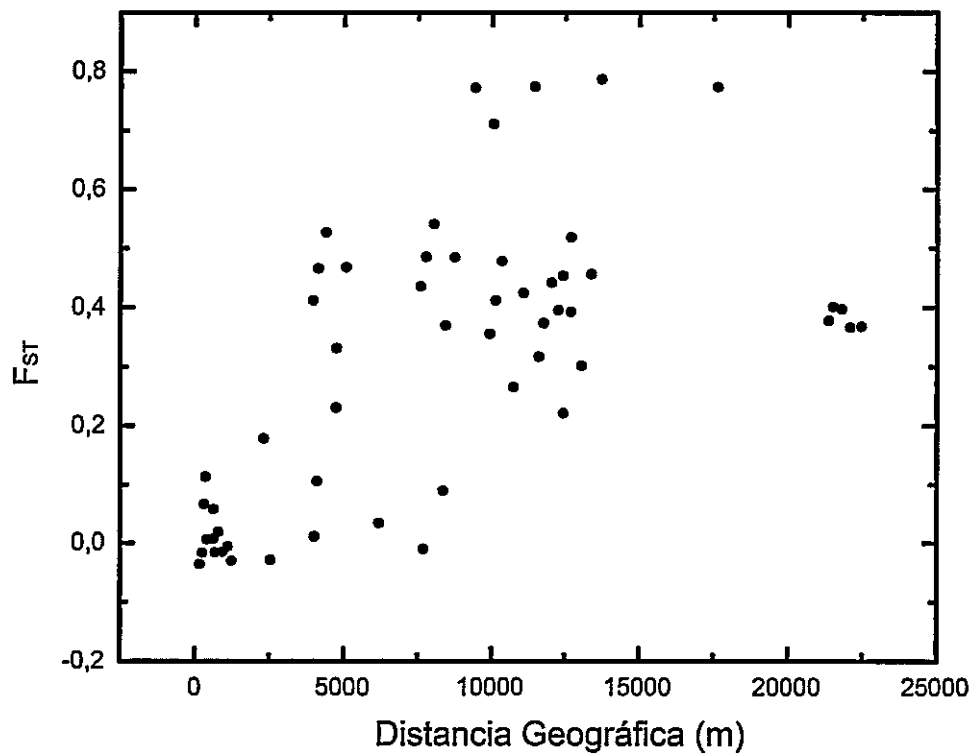


Figura 14. Correlación de Mantel en *Heleobia ascotanensis* del salar de Ascotán entre la distancia geográfica (m) que separa cada par de vertientes y la distancia genética (F_{ST}) entre ellas. El valor del coeficiente correlación de Mantel, $r = 0,6052$ ($p = 0,0026$).

DISCUSIÓN

Diversidad genética

Los índices de diversidad genética (Tabla 3) muestran que existe una alta variabilidad ($K = 23$) entre los individuos de *H. ascotanensis*, sin embargo, al analizar y asignar los especímenes a las vertientes de procedencia, surgen dos niveles de variabilidad entre las vegas.

La mayor variabilidad entre secuencias que existe en la vertientes septentrionales (valores más altos de Π) es visualizado en la red de haplotipos (Fig. 8). En el network se aprecia que en las vertientes 2 a 6 se encuentran individuos de los haplogrupos 1 y 2. El Haplogrupo 1 (H1; más extendido espacialmente) contiene gasterópodos recolectados en las vertientes 2 a 10 y 12, mientras que el Haplogrupo 2 (H2; restringido en el norte del sistema) contiene a los recolectados en las vertientes 2 a 6. Por otro lado, los individuos recolectados en la Vertiente 11 componen un único haplogrupo (H3), con una red extendida lo que indicaría una población antigua y aislada del resto de las vertientes.

La disposición espacial de estos tres haplogrupos podría tener relación con la geografía del salar de Ascotán; el H1 abarca todo el sistema (exceptuando la Vertiente 11), el H2 se concentra sólo en las vertientes septentrionales del sistema

(vertientes 2 a la 6), y el H3 contiene únicamente a la Vertiente 11 (extremo meridional del salar). La gran extensión geográfica que alcanza el H1 dentro del sistema y el espacio acotado en el que se encuentra el H2, sugiere que existe un flujo genético unidireccional desde las vertientes del sur hacia las del norte, aunque esta proposición es especulativa y requiere de un mayor estudio. Este flujo putativo se puede asociar al perfil altitudinal que presenta el salar (Figura 15), ya que las vegas que están más al sur en el salar se encuentran a mayor altura que las que se ubican en la zona norte del sistema (Keller & Soto, 1998). Por ende, en eventos de inundación del salar, producto de anomalías en los períodos de precipitación, como se han reportado para el altiplano (Morales *et al.*, 2012), el movimiento de las masas de agua ocurriría desde el sur hacia el norte, por tanto individuos de las vertientes meridionales podrían alcanzar las vertientes septentrionales del salar. Con respecto al H3, la gran distancia que separa la Vertiente 11 del resto, impediría que los gasterópodos alcanzaran las vertientes que se encuentran más hacia el norte.

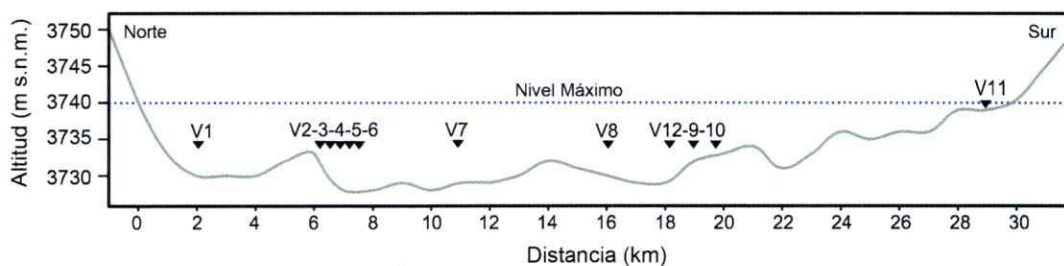


Figura 15. Perfil altitudinal del salar de Ascotán. Se indica el nivel máximo que habría alcanzado el agua en el período húmedo, y la posición de las vertientes (Cruz-Jofré, datos no publicados).

Otra explicación para dar cuenta de la posible dispersión de individuos es que el movimiento podría estar mediado por aves. Recientemente se ha postulado que para diferentes especies de gasterópodos, el transporte pasivo mediado por aves podría explicar la identidad genética entre poblaciones separadas por extensas distancias geográficas (van Leeuwen, 2012; van Leeuwen *et al.*, 2012a, 2012b, 2013). Sin embargo, la evidencia existente en *Heleobia* no es suficiente para proponer esta hipótesis como explicación que de cuenta de la distribución encontrada y es necesario realizar análisis más inclusivos para abordar esta interrogante.

Estructura poblacional de *H. ascotanensis*

Los análisis moleculares realizados sugieren la existencia de tres grupos genéticamente diferenciados en el salar de Ascotán. Estos grupos genéticos están adscritos a vertientes que se encuentran geográficamente cercanas. Probablemente, estas vegas han estado aisladas desde el último período húmedo

que existió en el Altiplano, período que posiblemente coincidió con el evento del gran paleolago Tauca en Bolivia hace 11.000 años atrás (Placzek *et al.*, 2006). Si bien la evidencia indica que el salar de Ascotán no formó parte del Tauca, se ha reportado que en el salar existió un lago de 30 m de profundidad hace 13.000 – 8.500 años atrás (Grosjean & Veit, 2005). Los resultados de estructuración genética en *H. ascotanensis* son similares a los obtenidos en otros gasterópodos que habitan ambientes naturalmente fragmentados (Moline *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2012; Morningstar *et al.*, 2014).

El análisis realizado en GENELAND infirió que en el salar de Ascotán existen tres clusters genéticos de la especie *H. ascotanensis*. El primero de ellos (Población 1) contiene a los individuos de las vertientes 2 a 6; el segundo (Población 2) está compuesto por las vertientes centrales (7, 8, 9, 10 y 12); la Población 3 sólo contiene individuos de la Vertiente 11 y debido a distancia entre esta vertiente y el resto del sistema, es poco probable que exista comunicación con las otras vegas. Posiblemente las vertientes que componen la Población 1 entran en contacto esporádicamente, presentando una dinámica de tipo metapoblacional, donde los gasterópodos de este grupo de vegas podrían presentar un bajo nivel de migración y flujo génico. Caso similar ocurriría con las vertientes de la Población 2, pero resulta poco probable que exista flujo entre las poblaciones 1 y 2 debido a la distancia geográfica que las separa. Sin embargo, las probabilidades posteriores que soportan la existencia de los tres grupos

obtenidas en el análisis GENELAND son bajas, por tanto es necesario ampliar el estudio utilizando otros marcadores moleculares (secuencias nucleares, microsatélites, etc.) para evaluar y validar el patrón obtenido.

Estructura genética de *Heleobia ascotanensis* y taxa co-distribuidos en el salar de Ascotán

La presencia de vertientes no diferenciadas genéticamente en el salar Ascotán es un hallazgo que coincide con lo obtenido en peces del género *Orestias* y gasterópodos del género *Biomphalaria* (resultados obtenidos utilizando secuencias *D-Loop* y *COI*, respectivamente). Sin embargo, la conformación de los grupos genéticos hallados en *Heleobia* no es idéntica a los obtenidos en taxa co-distribuidos (Fig. 16). En *H. ascotanensis* (este estudio) se infirieron tres grupos genéticos: Población 1 (vertientes 2 a 6), Población 2 (vertientes 7 a 10 y 12), y Población 3 (Vertiente 11); en *Biomphalaria crequii* se infirieron tres grupos genéticos (Collado & Méndez, 2013): Población 1 (vertientes 2 a 8), Población 2 (vertientes 9 y 10), y Población 3 (Vertiente 11); por último en *Orestias ascotanensis* la evidencia sugirió la existencia de cuatro haplogrupos (Morales *et al.*, 2011; Vila *et al.*, 2013): Grupo 1 (Vertiente 1), Grupo 2 (vertientes 2 a 7), Grupo 3 (vertientes 8 a 10 y 12), y Grupo 4 (Vertiente 11).

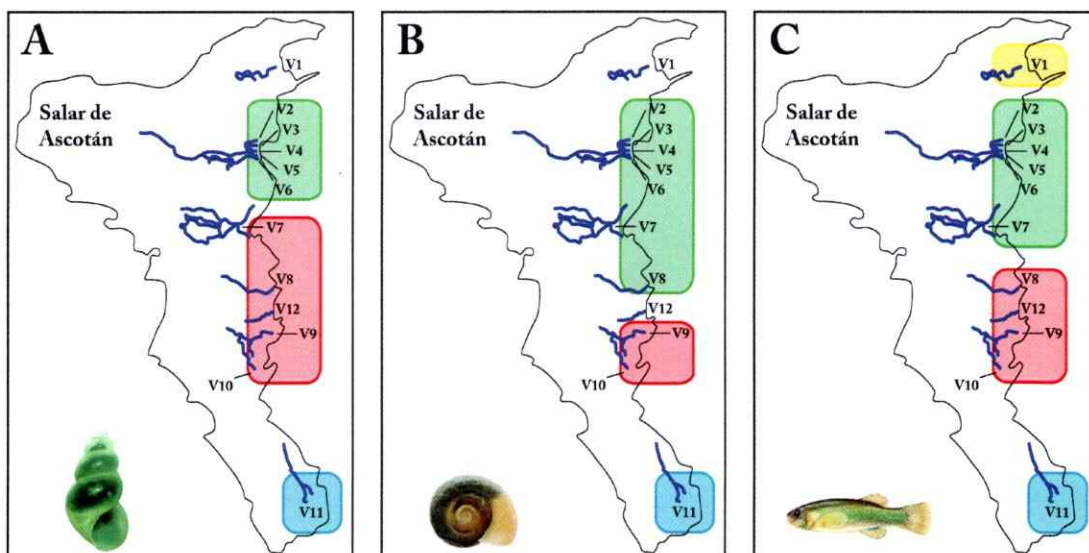


Figura 16. Vertientes asignadas de acuerdo a los grupos genéticos determinados en 3 especies que habitan el salar de Ascotán, **A)** gasterópodos de la especie *Heleobia ascotanensis* (este estudio); **B)** gasterópodos de la especie *Biomphalaria crequii* (de acuerdo a Collado & Méndez, 2013); **C)** peces de la especie *Orestias ascotanensis* (de acuerdo a Morales *et al.*, 2011).

Para las tres especies de las que se tiene información genética, las vertientes de los extremos del salar de Ascotán (vegas 1 y 11) contienen individuos que presentan haplotipos únicos, que sólo se encuentran en estas vertientes aisladas, excepto gasterópodos, dado que no se han encontrado individuos en la Vertiente 1. Por otro lado, la extensa distancia geográfica y el perfil altitudinal del salar son condiciones que hacen improbable una conexión entre las vertientes indicadas y el resto del sistema.

Con respecto a las vertientes centrales del salar (2 a la 10 y Vertiente 12), la composición de los grupos genéticos que se han determinado en estas vegas

varía de acuerdo al taxon analizado (Fig. 16). Estos resultados indican que existen diferencias en la estructura genética de los taxa endémicos del salar de Ascotán. Estos patrones especie-específicos implican que las diferencias evolutivas y de historia de vida (atributos biológicos de la especie como la capacidad de dispersión o tipo de reproducción) son determinantes de la estructura poblacional en el sistema. Cabe mencionar que para especies de *Heleobia* se han reportado diferentes estrategias reproductivas (Martin, 2002; Neves & Valentin, 2010; Collado & Méndez, 2011; Neves *et al.*, 2012), sin embargo para *H. ascotanensis* sólo se ha descrito la morfología del aparato reproductor (Collado *et al.*, 2011a).

Los resultados obtenidos en *H. ascotanensis* y los reportados en *Biomphalaria* y *Orestias* del salar de Ascotán, sugieren diferencias en la estructuración genética de las especies estudiadas, estos resultados son similares a los obtenidos en taxa que co-habitan vertientes aisladas en otros sistemas hidrológicos similares al de este estudio (Myers *et al.*, 2001; Zickovich & Bohonak, 2007; Murphy *et al.*, 2010). De esta manera, la evidencia obtenida sugiere que, para los taxa estudiados del salar de Ascotán, la identidad de cada especie tendría un mayor efecto en la historia evolutiva del taxon que la estructura del paisaje, oponiéndose a la visión que indica que las características del hábitat predominan en la diferenciación genética de una especie (Marten *et al.*, 2006).

Variación morfológica en *Heleobia ascotanensis*

Los resultados obtenidos indican que no existe una diferenciación morfológica entre los individuos de las vertientes analizadas en este estudio. Aunque los análisis resultaron significativos, existe una sobreposición considerable en el espacio multivariado. Los análisis morfométricos indican que sólo los individuos de la Vertiente 11 presentan una diferencia morfológica con respecto a las otras vertientes.

El hecho que la variación molecular no esté acompañada de una variación morfológica, posiblemente tiene relación con una conexión putativa entre las vertientes que se encuentran cercanas geográficamente, lo que podría desfavorecer la diferenciación morfológica, ya que los grupos encontrados se comportarían como poblaciones con cierto grado de flujo génico, y teniendo en consideración que cuando la migración entre localidades es alta, las adaptaciones fenotípicas locales pueden ser disminuidas por el efecto homogenizador del flujo genético (Bertness & Gaines, 1993).

Una posible causa de la conexión de las vertientes serían las precipitaciones que ocurren entre los meses de verano en la región (diciembre a marzo, aproximadamente), período conocido como Monzón Sudamericano de Verano (SASM, por sus siglas en inglés) (Zhou & Lau, 1998; Garreaud *et al.*, 2009; Marengo *et al.*, 2012) o coloquialmente como "invierno altiplánico". Es durante este período que caen las únicas precipitaciones anuales. Estas lluvias, particularmente

durante las anomalías en la precipitación producto de la Oscilación del Sur El Niño (ENSO, por sus siglas en inglés) (Morales *et al.*, 2012), podrían haber aumentado el nivel de agua dentro de las vertientes, conectándolas en sentido sur-norte (de acuerdo al perfil altitudinal), a excepción de la Vertiente 11 que se encuentra aislada, debido a la gran distancia geográfica que la separa de las otras vertientes.

Variación genética, morfológica y distancias geográficas

El análisis GENELAND sugiere que existe una variación genética asociada a la disposición geográfica de las vertientes; los resultados obtenidos indican que existen discontinuidades genéticas entre las vertientes, y que las vegas están agrupadas en tres clusters. Los resultados obtenidos en el análisis GENELAND fueron confirmados por la prueba de Mantel, la que sugiere que existe aislamiento por distancia entre las vertientes del salar y que las vertientes más alejadas presentan una variación genética mayor que las ubicadas más cercanas geográficamente.

Por otro lado, no se encontraron variaciones morfológicas relacionadas con las variaciones genéticas o geográficas.

Procesos evolutivos en el salar de Ascotán

Los resultados obtenidos permiten postular un proceso de diferenciación que ha ocurrido en *H. ascotanensis*: cuando el nivel lacustre del salar disminuyó y llegó al nivel actual, la fragmentación del hábitat causó la pérdida de muchos haplotipos. De esta manera, la diversidad genética de la especie disminuyó.

Las vertientes que quedaron aisladas presentan grupos que están divergiendo genéticamente, pues contienen haplotipos que no se encontraron en otras vegas. Es posible que si se mantuvieran aisladas por un tiempo suficiente, podrían llegar a transformarse en especies distintas. El ejemplo más claro de esto ocurre en la Vertiente 11, ya que esta vega se encuentra alejada geográficamente del resto, presenta diferencias genéticas con respecto a las otras vertientes del salar, además es la única vertiente que presenta individuos con cierto grado de diferenciación morfológica. Cabe mencionar que esta variación molecular también existe en las especies de *Orestias* y *Biomphalaria*.

El escenario actual en el salar de Ascotán indica que las poblaciones de *Heleobia* se encuentran aisladas geográficamente, y están confinadas en pequeñas vertientes que están parcial o totalmente aisladas. Sin embargo, este escenario se contrapone a lo ocurrido durante el Pleistoceno, período en el cual el salar de Ascotán probablemente constituía un sistema hidrológico que abarcaba y conectaba a todas las vertientes analizadas en este estudio (Keller & Soto, 1998). El paso a un período seco aisló estas vegas, y restringió la distribución de los gasterópodos a espacios alejados entre sí, formando el sistema de vertientes que existe en la actualidad. La aparición de estas barreras geográficas y los resultados obtenidos en los análisis moleculares sugieren que procesos de vicarianza han estimulado la diferenciación genética de la población de *H. ascotanensis* de la Vertiente 11. Con respecto a las vertientes centrales y septentrionales del sistema,

la estructura genética probablemente se generó en un escenario diferente, dado que presentan una alta diversidad genética y comparten haplotipos, las diferencias genéticas encontradas se podrían explicar por una disminución del flujo genético debido a la gran distancia geográfica entre las vertientes. Estas vegas podrían estar conectadas durante eventos del SASM, período en el cual el flujo genético podría mantener la alta variabilidad genética observada. Los procesos evolutivos inferidos en este estudio son similares a los propuestos en *Biomphalaria* y *Orestias* en la región sur del Altiplano (Collado *et al.*, 2011b; Collado & Méndez, 2013; Collado *et al.*, 2013; Vila *et al.*, 2013; Collado *et al.*, 2014). De este modo, la fragmentación del hábitat, la aparición de barreras y la disminución del flujo genético jugarían un papel fundamental en la divergencia genética de algunos grupos y, más tarde, en la generación de nuevas especies.

En concomitancia con lo anterior, también es probable que exista dispersión entre las vertientes que se encuentran cercanas geográficamente, el flujo génico putativo podría deberse a conexiones subterráneas inadvertidas, o a dispersión pasiva por movimiento de aguas (durante los monzones de verano en eventos ENSO), o bien una dispersión pasiva mediada por aves.

Protección de poblaciones en ambientes naturalmente fragmentados

Los sistemas hidrológicos compuestos de vertientes con cierto grado de aislamiento y en un ambiente desértico son hábitats donde han evolucionado especies endémicas en una variedad de grupos, los cuales aparentemente han

especiado en condiciones relativamente estables y aisladas (Moline *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2009; Sei *et al.*, 2009; Trajanovski *et al.*, 2010; Collado *et al.*, 2013). El presente estudio muestra cómo la identificación de poblaciones genéticamente diferenciadas en un gasterópodo endémico entrega información de la estructura hidrológica que subyace un complejo sistema de vertientes como es el salar de Ascotán.

Los resultados indican que la variabilidad genética encontrada en los individuos de *H. ascotanensis* se puede dividir en dos grupos, en primer lugar, gran parte de la variabilidad genética está contenida en las vertientes septentrionales del sistema (vertientes 2 a la 6), por otro lado, en el resto de las vertientes (7 a la 10 y la Vertiente 12) habitan individuos con haplotipos compartidos con las vertientes del norte. Entonces, el impacto de la desaparición de las vertientes septentrionales sería mucho mayor, a nivel de variabilidad genética, que la remoción de las vertientes centrales del sistema. Por ende, la protección de las vertientes 2 a la 6 sería imperativa, considerando los resultados del presente estudio, con el fin de mantener la variabilidad genética que se encuentra al interior del salar de Ascotán.

En segundo lugar, la Vertiente 11 contiene individuos genética y morfológicamente diferenciados del resto del salar, además la gran distancia que separa esta vega de las otras reduce la probabilidad de conexión entre las vertientes. De esta manera la población de *H. ascotanensis* que se encuentra en

la V11 podría constituir una unidad evolutiva significativa (o al menos parcialmente) (Fraser & Bernatchez, 2001; Guia & Saitoh, 2006), dado que constituye una población genéticamente separada del resto, y contribuye sustancialmente a la diversidad genética encontrada en la especie (Hey *et al.*, 2003).

CONCLUSIONES

Heleobia ascotanensis presenta estructuración genética al interior del salar de Ascotán. Las poblaciones que existen en el sistema de estudio están diferenciadas genéticamente y se reconocen haplogrupos restringidos a vertientes que podrían tener cierto grado de flujo genético. Sin embargo, la variación genética encontrada no es acompañada con una variación morfológica, ya que sólo los individuos de la Vertiente 11 se diferencian del resto del sistema.

La estructura poblacional encontrada en *H. ascotanensis* es similar a la hallada en *Biomphalaria* y *Orestias* (taxa co-distribuidos en el salar de Ascotán), sin embargo la conformación de los grupos genéticos no es idéntica, lo que indica que los atributos biológicos de la especie (e.g. capacidad de dispersión) predominan sobre la estructura del paisaje en la historia evolutiva de las especies.

Los individuos de *H. ascotanensis* que habitan la Vertiente 11 del salar de Ascotán, presentan una alta diferenciación genética y morfológica con respecto a los gasterópodos de las otras vegas. Esta población confinada al extremo meridional del salar constituiría una unidad evolutiva significativa (ESU) (Guia & Saitoh, 2006).

Sistemas hidrológicos como el salar de Ascotán requieren de estudios a fina escala, con el fin de proteger estos hábitats fragmentados y la diversidad biológica única que contienen estos ecosistemas amenazados.

REFERENCIAS

- Alda, P., Bonel, N., Cazzaniga, N.J. & Martorelli, S.R. 2010. Effects of parasitism and environment on shell size of the South American intertidal mud snail *Heleobia australis* (Gastropoda). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 87: 305–310.
- Alonso, A. & Castro-Díez, P. 2008. What explains the invading success of the aquatic mud snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca)? *Hydrobiologia* 614: 107–116.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. & Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489–522.
- Bandelt, H.J., Forster, P. & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37–48.
- Bertness, M.D. & Gaines, S.D. 1993. Larval Dispersal and Local Adaptation in Acorn Barnacles. *Evolution (N. Y.)* 47: 316.

- Bousset, L., Henry, P.-Y., Sourrouille, P. & Jarne, P. 2004. Population biology of the invasive freshwater snail *Physa acuta* approached through genetic markers, ecological characterization and demography. *Mol. Ecol.* 13: 2023–36.
- Brönmark, C., Lakowitz, T. & Hollander, J. 2011. Predator-induced morphological plasticity across local populations of a freshwater snail. *PLoS One* 6: e21773.
- Chiu, Y.-W., Chen, H.-C., Lee, S.-C. & Chen, C.A. 2002. Morphometric Analysis of Shell and Operculum Variations in the Viviparid Snail, *Cipangopaludina chinensis* (Mollusca: Gastropoda), in Taiwan. *Zool. Stud.* 41: 321–331.
- Collado, G.A. & Méndez, M.A. 2011. Estrategias reproductivas y tipos de desarrollo en especies endémicas del género *Heleobia* Stimpson, 1865 (Caenogastropoda: Cochliopidae) de Chile. *Amici Molluscarum* 67–71.
- Collado, G.A., Méndez, M.A., Letelier, S.L., Véliz, D. & Sabando, M.C. 2011a. Morfología peniana y taxonomía de especies chilenas del género *Heleobia* Stimpson, 1865 (Caenogastropoda: Cochliopidae) junto a una revisión de los ejemplares tipo del Museo Nacional de Historia Natural de Chile. *Amici Molluscarum* no-no: 49–58.
- Collado, G.A., Vila, I. & Méndez, M.A. 2011b. Monophyly, candidate species and vicariance in *Biomphalaria* snails (Mollusca: Planorbidae) from the Southern Andean Altiplano. *Zool. Scr.* 40: 613–622.

- Collado, G.A. & Méndez, M.A. 2012. Los taxa nominales de moluscos descritos por Courty del Salar de Ascotán , Altiplano chileno. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 85: 233–235.
- Collado, G.A. & Méndez, M.A. 2013. Microgeographic differentiation among closely related species of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) from the Andean Altiplano. *Zool. J. Linn. Soc.* 169: 640–652.
- Collado, G.A., Valladares, M.A. & Méndez, M.A. 2013. Hidden diversity in spring snails from the Andean Altiplano, the second highest plateau on Earth, and the Atacama Desert, the driest place in the world. *Zool. Stud.* 52: 50.
- Collado, G.A., Salinas, H.F. & Méndez, M.A. 2014. Genetic, morphological, and life history traits variation in freshwater snails from extremely high environments of the Andean Altiplano. *Zool. Stud.* 53: 14.
- Courty, G. 1907. *Explorations géologiques dans l’Amérique du Sud. In: Mission Scientifique de G. de Crèqui Montefort et E. Sénéchal de la Grange*, 1st ed. Impremiere Nationale.
- Dillon, R.T. 1984. Geographic Distance, Environmental Difference, and Divergence Between Isolated Populations. *Syst. Biol.* 33: 69–82.
- Dryden, I.L. & Mardia, K. V. 1998. *Statistical shape analysis*. Wiley.

- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1: 47–50.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial *cytochrome c oxidase subunit I* from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 294–9.
- Fornari, M., Risacher, F. & Féraud, G. 2001. Dating of paleolakes in the central Altiplano of Bolivia. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 172: 269–282.
- Fraser, D.J. & Bernatchez, L. 2001. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Mol. Ecol.* 10: 2741–52.
- Garreaud, R.D., Vuille, M., Compagnucci, R. & Marengo, J. 2009. Present-day South American climate. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 281: 180–195. Elsevier B.V.
- Goodfriend, G.A. 1986. Variation in Land-snail Shell form and Size and its Causes: a Review. *Syst. Biol.* 35: 204–223.
- Grosjean, M. & Veit, H. 2005. Water resources in the Arid Mountains of the Atacama Desert (Northern Chile): Past climate changes and modern conflicts. In: *Global Change and Mountain Regions: An Overview of Current Knowledge*

(Huber, U., H. Bugmann, & M. Reasoner, eds), pp. 93–104. Springer Netherlands.

- Guerra-Varela, J., Colson, I., Backeljau, T., Breugelmans, K., Hughes, R.N. & Rolán-Alvarez, E. 2007. The evolutionary mechanism maintaining shell shape and molecular differentiation between two ecotypes of the dogwhelk *Nucella lapillus*. *Evol. Ecol.* 23: 261–280.
- Guia, A.P.O. & Saitoh, T. 2006. The gap between the concept and definitions in the Evolutionarily Significant Unit: the need to integrate neutral genetic variation and adaptive variation. *Ecol. Res.* 22: 604–612.
- Guillot, G., Mortier, F. & Estoup, A. 2005. Geneland: a computer package for landscape genetics. *Mol. Ecol. Notes* 5: 712–715.
- Haase, M. 2003. Clinal variation in shell morphology of the freshwater gastropod *Potamopyrgus antipodarum* along two hill-country streams in New Zealand. *J. R. Soc. New Zeal.* 33: 549–560.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Hammer, Ø., Harper, D. & Ryan, P. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* 4: 9.

- Hariri, K. El & Bachnou, A. 2004. Describing Ammonite shape using Fourier analysis. *J. African Earth Sci.* 39: 347–352.
- Hey, J., Waples, R.S., Arnold, M.L., Butlin, R.K. & Harrison, R.G. 2003. Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 18: 597–603.
- Iwata, H. & Ukai, Y. 2002. SHAPE: a computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *J. Hered.* 93: 384–5.
- Johnson, S.G. 2005. Age, phylogeography and population structure of the microendemic banded spring snail, *Mexipyrgus churinceanus*. *Mol. Ecol.* 14: 2299–311.
- Keller, B. & Soto, D. 1998. Hydrogeologic influences on the preservation of *Orestias ascotanensis* (Teleostei: Cyprinodontidae), in Salar de Ascotan, northern Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 71: 147–156.
- Kemp, P. & Bertness, M.D. 1984. Snail shape and growth rates: Evidence for plastic shell allometry in *Littorina littorea*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 811–813.
- Klingenberg, C.P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Resour.* 11: 353–7.

- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–2.
- Lüssen, A., Falk, T.M. & Villwock, W. 2003. Phylogenetic patterns in populations of Chilean species of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae): results of mitochondrial DNA analysis. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29: 151–160.
- Marengo, J.A., Liebmann, B., Grimm, A.M., Misra, V., Silva Dias, P.L., Cavalcanti, I.F.A., Carvalho, L.M. V., Berbery, E.H., Ambrizzi, T., Vera, C.S., Saulo, a. C., Noguez-Paegle, J., Zipser, E., Seth, A. & Alves, L.M. 2012. Recent developments on the South American monsoon system. *Int. J. Climatol.* 32: 1–21.
- Marten, A., Brändle, M. & Brandl, R. 2006. Habitat type predicts genetic population differentiation in freshwater invertebrates. *Mol. Ecol.* 15: 2643–51.
- Martin, P.R. 2002. Evidence for parthenogenesis and natural imposex in the Patagonian freshwater snail *Heleobia hatcheri* (Gastropoda: Hydrobiidae). *J. Molluscan Stud.* 68: 291–295.
- Minton, R.L., Norwood, A.P. & Hayes, D.M. 2008. Quantifying phenotypic gradients in freshwater snails: a case study in *Lithasia* (Gastropoda: Pleuroceridae). *Hydrobiologia* 605: 173–182.

- Moline, A.B., Shuster, S.M., Hendrickson, D.A. & Marks, J.C. 2004. Genetic variation in a desert aquatic snail (*Nymphophilus minckleyi*) from Cuatro Ciénegas, Coahuila, Mexico. *Hydrobiologia* 522: 179–192.
- Morales, P., Vila, I. & Poulin, E. 2011. Genetic structure in remnant populations of an endangered cyprinodontid fish, *Orestias ascotanensis*, endemic to the Ascotán salt pan of the Altiplano. *Conserv. Genet.* 12: 1639–1643.
- Morales, M.S., Christie, D., Villalba, R., Argollo, J., Pacajes, J., Silva, J.S., Alvarez, C., Llancabure, J.C. & Soliz Gamboa, C.C. 2012. Precipitation changes in the South American Altiplano since 1300 AD reconstructed by tree-rings. *Clim. Past* 8: 653–666.
- Morningstar, C.R., Inoue, K., Sei, M., Lang, B.K. & Berg, D.J. 2014. Quantifying morphological and genetic variation of sympatric populations to guide conservation of endangered, micro-endemic springsnails. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 24: 536–545.
- Murphy, N.P., Adams, M. & Austin, A.D. 2009. Independent colonization and extensive cryptic speciation of freshwater amphipods in the isolated groundwater springs of Australia's Great Artesian Basin. *Mol. Ecol.* 18: 109–22.

- Murphy, N.P., Guzik, M.T. & Wilmer, J.W. 2010. The influence of landscape on population structure of four invertebrates in groundwater springs. *Freshw. Biol.* 55: 2499–2509.
- Murphy, N.P., Breed, M.F., Guzik, M.T., Cooper, S.J.B. & Austin, A.D. 2012. Trapped in desert springs: phylogeography of Australian desert spring snails. *J. Biogeogr.* 39: 1573–1582.
- Myers, M.J., Sperling, F.A.H. & Resh, V.H. 2001. Dispersal of two species of Trichoptera from desert springs: Conservation implications for isolated vs connected populations. *J. Insect Conserv.* 5: 207–215.
- Neves, R.A.F. & Valentin, J. 2010. Morphological description of the gastropod *Heleobia australis* (Hydrobiidae) from egg to hatching. *Brazilian J. Biol.* 58: 247–250.
- Neves, R.A.F., Valentin, J.L. & Figueiredo, G.M. 2012. First record of imposex in *Heleobia australis* (Caenogastropoda: Cochliopidae). *J. Molluscan Stud.* 79: 82–85.
- Placzek, C., Quade, J. & Patchett, P.J. 2006. Geochronology and stratigraphy of late Pleistocene lake cycles on the southern Bolivian Altiplano: Implications for causes of tropical climate change. *Geol. Soc. Am. Bull.* 118: 515–532.

- Richards, D.C. & Arrington, T.D. 2008. Threatened Bliss Rapids snail's susceptibility to desiccation: Potential impact from hydroelectric facilities. *Am. Malacol. Bull.* 24: 91–96.
- Risacher, F., Alonso, H. & Salazar, C. 1999. *Geoquímica de aguas en cuencas cerradas: I, II y III Regiones (Chile)*. Ministerio de Obras Publicas (Dirección General de Aguas), Universidad Católica del Norte, Institut de Recherche pour le Développement, Convenio de Cooperación DGA-UCN-IRD. Volumen III, S.I.T N° 51, Santiago, Chile.
- Risacher, F., Alonso, H. & Salazar, C. 2003. The origin of brines and salts in Chilean salars: a hydrochemical review. *Earth-Science Rev.* 63: 249–293.
- Rohlf, F.J. 2010. tps DIG 2.16. *Dep. Ecol. Evol. State Univ. New York Stony Brook, Stony Brook, New York.*
- Sánchez, R., Sepúlveda, R., Brante, a & Cárdenas, L. 2011. Spatial pattern of genetic and morphological diversity in the direct developer *Acanthina monodon* (Gastropoda: Mollusca). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 434: 121–131.
- Sei, M., Lang, B.K. & Berg, D.J. 2009. Genetic and community similarities are correlated in endemic-rich springs of the northern Chihuahuan Desert. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 18: 192–201.

- Strecker, M.R., Alonso, R.N., Bookhagen, B., Carrapa, B., Hilley, G.E., Sobel, E.R. & Trauth, M.H. 2007. Tectonics and Climate of the Southern Central Andes. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 35: 747–787.
- SYSTAT. 2000. SYSTAT Software - Version 10. SPSS Inc., Chicago.
- Trajanovski, S., Albrecht, C., Schreiber, K., Schultheiß, R., Stadler, T., Benke, M. & Wilke, T. 2010. Testing the spatial and temporal framework of speciation in an ancient lake species flock: the leech genus *Dina* (Hirudinea: Erpobdellidae) in Lake Ohrid. *Biogeosciences* 7: 3387–3402.
- Van Leeuwen, C., van der Velde, G., van Lith, B. & Klaassen, M. 2012a. Experimental quantification of long distance dispersal potential of aquatic snails in the gut of migratory birds. *PLoS One* 7: e32292.
- Van Leeuwen, C. 2012. Speeding up the snail's pace: Bird-mediated dispersal of aquatic organisms. Radboud University Nijmegen.
- Van Leeuwen, C., van der Velde, G., van Groenendael, J. & Klaassen, M. 2012b. Gut travellers: internal dispersal of aquatic organisms by waterfowl. *J. Biogeogr.* 39: 2031–2040.
- Van Leeuwen, C., Huig, N., Van Der Velde, G., Van Alen, T., Wagemaker, C., Sherman, C., Klaassen, M. & Figuerola, J. 2013. How did this snail get here?

- Several dispersal vectors inferred for an aquatic invasive species. *Freshw. Biol.* 58: 88–99.
- Vila, I., Méndez, M.A., Scott, S., Morales, P. & Poulin, E. 2006. Threatened fishes of the world: *Orestias ascotanensis* Parenti, 1984 (Cyprinodontidae). *Environ. Biol. Fishes* 80: 491–492.
- Vila, I., Morales, P., Scott, S., Poulin, E., Véliz, D., Harrod, C. & Méndez, M.A. 2013. Phylogenetic and phylogeographic analysis of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) in the southern Chilean Altiplano: the relevance of ancient and recent divergence processes in speciation. *J. Fish Biol.* 82: 927–43.
- Williams, S.T., Hall, A. & Kuklinski, P. 2012. Unraveling Cryptic Diversity in the Indo-West Pacific Gastropod Genus *Lunella* (Turbinidae) using Elliptic Fourier Analysis *. *Am. Malacol. Bull.* 30: 189–206.
- Winnepenninckx, B., Backeljau, T. & De Wachter, R. 1993. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends Genet. TIG* 9: 407.
- Yoshioka, Y., Iwata, H., Ohsawa, R. & Ninomiya, S. 2004. Analysis of petal shape variation of *Primula sieboldii* by elliptic fourier descriptors and principal component analysis. *Ann. Bot.* 94: 657–64.

Zahn, C.T. & Roskies, R.Z. 1972. Fourier Descriptors for Plane Closed Curves.

IEEE Trans. Comput. C-21: 269–281.

Zhou, J. & Lau, K.-M. 1998. Does a Monsoon Climate Exist over South America?

J. Clim. 11: 1020–1040.

Zickovich, J.M. & Bohonak, A.J. 2007. Dispersal ability and genetic structure in

aquatic invertebrates: a comparative study in southern California streams and

reservoirs. *Freshw. Biol.* 52: 1982–1996.